ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2021;23(5):37-45

Evaluation the effects of Fumaria parviflora aqueous extracts on Leishmania major in vitro and in vivo

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Simin A[1]
Ghaffarifar[*] F[2]
Hamid Delavari H[3]
Bineshian F.[4]

1-M.Sc in parasitology,faculty of medical sciences,Tarbiat modares university,Tehran,Iran a.simin1398@gmail.com)(
2-Professor, Department of in Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (ghafarif@modares.ac.ir)
3-Assistant Professor, Nanomaterials Group, Department of Materials Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
(hamid.delavari@modares.ac.ir)
4- Asistant Professor , Parasitology and Mycology Dept., Faculty of Medical Sciences, Semnan University of Medical Sciences. (fzbineshian@yahoo.com).

***Correspondence**
Parasitology and Entomology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran, P.O. Box 14115-331. Tel: +982182884553, Fax: +982182884555
E-mail: ghafarif@modares.ac.ir

Article History
Received: May 8, 2020
Accepted: April 7, 2021
ePublished: March 6, 2021

ABSTRACT

Objective : In the present study the effect of aqueous extract of *Fumaria* which is a native Iranian herb on the promastigote and amasstigot under In vitro and In vivo condition.
Materials and Methods: The aqueous extract of the plant was prepared, then it was evaluated the effect of different concentration of aqueous extract under *In vitro* condition on promastigotes, uninfected macrophages and macrophages infected with amastigotes by counting, MTT and Flow Cytometyry were evaluated. IC50 was calculated for promastigotes. Also, the effects of aqueous extracts of *Fumaria* ointment on lesions caused by *Leishmani major* in *BALB / c* mice were examined.
Results: The calculated IC50 of Funaria extract on promastigotes after 72 h was 304.17 µg/ml. The effects of *Fumaria* extract showed effective limitation on lesion size. The survival rate for treated mice with Fumaria extract showed significant differences with control groups.
Conclusion: The results showed that aqueous extract of Fumaria has antileishmanial effects in vitro and invivo condition. Also aqueous extract of Fumaria showed low toxicity against macrophages than pentavalent antimonials.

Keyword: Fumaria, Leishmania major, Antileishmanial, In vitro, In vivo.

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

بررسی أثر عصاره آبی گیاه شاهتره (Fumaria parviflora) روی لیشمانیای ماژور در شرایط برون تنی و درون تنی

آذرسیمین

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس a.simin@modares.ac.ir

فاطمه غفاری‌فر*

استاد گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ghafarif@modares.ac.ir

حمید دلاوری حسن کیاده

استادیار، گروه نانو مواد، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس hamid.delavari@modares.ac.ir

فرحناز بینشیان

استادیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان Bineshian@semums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: در پژوهش حاضر تاثیرعصاره آبی گیاه شاهتره که ازگیاهان بومی ایران است برپروماستیگوت و اماستیگوت لیشمانیا ماژوردرشرایط برون تنی ودرون تنی انجام شده است.

مواد و روش کار: پس از تهیه عصاره آبی، اثرغلظت‌های مختلف درشرایط برون تنی بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور،ماکروفاژهای غیرآلوده و ماکروفاژهای آلوده به اماستیگوت انگل با آزمون‌های شمارش، MTT و فلوسایتومتری سنجیده، Ic50 روی پروماستیگوت مشخص شد. عصاره آبی شاهتره به صورت پمادی برای درمان استفاده شد.همچنین تاثیر عصاره آبی به صورت پماد بر بهبود زخم‌های ناشی از لیشمانیا ماژور در موش‌های بالب سی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج:IC50 محاسبه شده برای عصاره شاتره روی پروماستیگوت‌ها پس از ۷۲ ساعت ۳۰٤,۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. بررسی تاثیر دارو بر قطر زخم‌ها نشان داد عصاره آبی در فعالیت ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد و می‌تواند رشد زخم را مهار کند. میزان بقا موش‌هایی که تحت درمان با عصاره آبی بودند با گروه کنترل و تحت درمان با وازلین اختلاف معناداری داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده ازاین مطالعه نشان می‌دهد که عصاره شاهتره دارای آثار ضدلیشمانیایی در شرایط برون تنی و درون تنی بوده و دارای سمیت کمتری بر ماکروفاژها نسبت به ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان دارد.

واژه‌های کلیدی: شاهتره،لیشمانیاماژور، اثرضدلیشمانیایی، برون تنی، درون تنی .

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱/۱۸

ghafarif@modares.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های آندمیک و انگلی در برخی از نقاط ایران است. بیش از ۷۵-۷۰ درصد موارد جهانی لیشمانیازیس جلدی از ایران گزارش شده است. ایران در منطقه خاورمیانه از نظر ابتلا به لیشمانیازیس جلدی در رتبه نخست و از نظر ابتلا به لیشمانیازیس احشایی در رتبه چهارم قرار دارد [۱]. لیشمانیوز ازلحاظ بالینی به سه دسته لیشمانیوزجلدی،احشایی، مخاطی-جلدی تقسیم می‌شود [۲].لیشمانیوز جلدی به دو شکل روستایی و شهری مشاهده شده است. لیشمانیوز جلدی روستایی بیماری مشترک انسان و حیوان بوده. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی لیشمانیا ماژور و عامل لیشمانیوز جلدی شهری لیشمانیا تروپیکا است [۳]. رایج ترین داروهای موجود استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان (پنتوستام و گلوکانتیم) است. سایرداروهای مورد استفاده عبارتند

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

از آمفوتریسین مترونیدازول، دیامیدین، پنتامیدین، آلوپورینول، کتوکونازول، استروکونازول، داپسون، پاراموماسین [٤، ٥]. گلوکانتیم رایج‌ترین دارویی است که در ایران استفاده می شود.استفاده این دارو به صورت موضعی دردناک و عوارض شایع از جمله بی اشتهایی، تب و لرز، درد مفاصل وغیره....معمولا در بیماران با مشکلات کبدی وکلیوی استفاده از این دارو توصیه نمی شود. همچنین به علت قیمت بالا این دارو و مشاهده مقاومت انگل به این دارو تلاش برای درمان‌های جایگزین زیاد شده است [٤، ٧ ،٦].

داروی گیاهی که در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت گیاه شاهتره است. شاهتره یک گیاه دارویی مهم است که در بسیاری از بیماری‌ها به عنوان داروی سنتی استفاده می‌شود از جمله این کاربردها در بیماری‌های پوستی، افزایش باروری مردان، ضد التهاب، ضد اسپاسم و درد و ملین، ضد استفراغ، تب ودرمان سوختگی [۹-۸].

Fumarioideae از زیر خانواده papaveraceae (خانواده خشخاش) است که دارای ۲۰ جنس و بیش از ۵۷۵ گونه است [۱۰]. این گیاه به نام‌های گوناگون در جهان نامگذاری شده در لاتین به نام fumus terrae یعنی دود زمین. در هند به نام‌های گوناگون pitpapra و shatra است [۱۰-۸]

در ایران ۷ گونه گیاهی علفی یکساله از جنس (fumaria L.) موجود است. گونه دارویی شاهتره در ایران F.parviflora است [۱۱]. گیاه دارای طعم تلخ، سبز رنگ و بدون بو است [۱۱]. این گیاه در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب به وسعت پهناوری از شمال ایران مانند، گیلان، مازندران، آذربایجان، فارس، شیراز، جزیره خارک، کرمان، خراسان، نیشابور، تهران، ورامین، چهارمحال بختیاری و ... می‌روید [۱۲]. مهمترین ترکیبات دارویی این گیاه آلکالوئیدهای آن است شامل فومارین، پروتوپین، کریپتوکاوین، اسکولرین و تتراهیدرو کوپتیسین و دارای املاح معدنی و ماده موثر گیاه شامل پتاسیم، فوماریک اسید، سینامیک اسید، فومارامیدین پارفومین، بیکوکولین و ترکیبات فلاونوئیدی است. مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی آن روتین است همچنین این گیاه حاوی مواد رزینی و موسیلاژ نیز هست [۱٤-۱۳]. استفاده از گیاهانی مثل ترشک Rumex،بومادران achillea millefolium ،اویشن، چای کوهی، برگ ازگیل،فلوس،هلیله زرد،گل میمون و ..... به دلیل وجود فلاونوییدها و آلکالوییدها، رزین و تانن و مواد موثر برای ازبین بردن انگل لیشمانیا مورد توجه قرارگرفته‌اند [۱۵-۲۰]. از عصاره متانولی کل گیاه شاهتره ترکیبی به نام N.octacosan- 7β-α جدا شد و خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی علیه C.albicans، E.Coli، A.niger وضد پروماستیگوتی آن به اثبات رسید [۲۱].

عصاره الکی ۵ گونه شاهتره علیه انگل‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم (مالاریا) و تریپانوزوم بروسی رودسینس بررسی شد که از میان این ۵ گونه Fumaria densiflora دارای آثار ضد مالاریایی ۹۳/۸۰ ٪ و ضد تریپانوزومی ۵۵/٤۰ ٪ بود [۲۲].

هدف از این پژوهش تهیه عصاره آبی شاتره و بررسی آثار ضدلیشمانیایی آن در شرایط درون تنی و برون تنی و همچنین بررسی اثرا سایتوتوکسیسیتی بر سلول‌های ماکروفاژ است.

مواد و روش‌ها

سویه انگلی که برای این پژوهش انتخاب شد (MRHO/IR/75/ER) سویه از لیشمانیا ماژور است که توسط ندیم از رومبومیس در منطقه اصفهان جدا شده است.

حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده

در این پژوهش از موش‌های آزمایشگاهی خالص از نوع BALB/c استفاده شده است. موش‌ها همگی ماده و در سن ۸ تا ٦ هفتگی بوده. حیوانات ذکر شده از موسسه سرم سازی رازی تهیه شده و در حیوان خانه متعلق به گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط استاندارد نگهداری شده‌اند.

شرایط In vitro

طرز تهیه عصاره آبی گیاه شاهتره

گیاه شاهتره از عطاری معتبر خریداری و زیر نظر کارشناس هر باریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تایید شد. کد هر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

باریوم متعلق به شاهتره ۸۰۷۱ است. ابتدا مقدار ۲۵ گرم از گیاه شاهتره خشک و آسیاب شده را به یک بشر ۱۰۰۰ سی‌سی منتقل کرده ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی آن ریخته شد به مدت ٦٠-٣٠ دقیقه آن را روی حرارت بسیار ملایم گذاشته قبل از جوشیدن از روی شعله برداشته شد و مدت ۳ روز در حالت استراحت و در دمای اتاق قرار دادیم پس از گذشت این مدت با کاغذ صافی، صاف شد. مایع صاف شده را با دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را جدا کرده در پلیت ریخته و در دمای اتاق می‌گذاریم تا آب آن تبخیر شده و بعد از خشک شدن در فریزر نگهداری می‌کنیم.

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 ٢×١٠^٦ پروماستیگوت) در حضور غلظت‌های مختلف و مشخص شده ٦٢,٥، ٢٥٠، ٥٠٠، ١٠٠٠، ٢٠٠٠، ٤٠٠٠ میکروگرم بر میلی لیتراز عصاره‌ی آبی در هنگام مدت زمان ٢٤، ٤٨ و٧٢ ساعته در سه پلیت جداگانه و به صورت تری پلیکیت در درجه حرارت ٢٢-٢٥ درجه سانتی‌گراد پی‌ریزی شده است. در هر پلیت ۳ چاهک فقط دارای پروماستیگوت و محیط و بدون هیچگونه دارویی است که این چاهک به عنوان کنترل آزمون است.و همچنین در هر پلیت در ۳ چاهک امفوتریسین و در ۳ چاهک دیگر گلوکانتیم به‌عنوان دارو اضافه می‌شود تا أثر عصاره‌ی آبی با این دو دارو مقایسه وارزیابی شوند.

اندازه‌گیری تکثیر پروماستیگوت‌ها به وسیله آزمایش MTT(3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide)

در هر چاهک از پلیت ٩٦ خانه ١٠٠ میکرولیتر از انگل حاوی ١٠^٦ در میلی لیتراز پروماستیگوت اضافه شد.

سپس دارو یا عصارها را با غلظت‌های مختلف µg/ml، ٤٠٠٠، ٢٠٠٠ و ١٠٠٠ و ٥٠٠ و ٢٥٠ و ١٢٥و ٦٢,٥ به چاهک‌های حاوی پروماستیگوت به صورت جداگانه اضافه شد حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. پلیتها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۱۸-25 درجه قرار داده شدند.بعد از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون به هر چاهک مقدار µl ۲۰ از محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتراضافه شد. پلیت‌ها دوباره به مدت ٤ ساعت انکوبه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد.مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع شده و دور ریخته می‌شود به طوری که سلول‌ها در ته پلیت ته نشین شدند.به هر چاهک مقدار µl ۱۰۰ از DMSO اضافه شد.جذب حاصل در طول موج٥٤٠ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدرخوانده شد.نتایج آزمایش به صورت OD محاسبه شد.

آزمایش MTT برروی ماکروفاژها(برای بررسی سمیت دارو بر سلول)

دقیقا به روش کشت پروماستیگوت‌ها کشت سلول‌های ماکروفاژ نیز انجام می‌شود فقط به جای انگل از لاین سلولی j774 ماکروفاژ به همان تعداد استفاده می‌کنیم.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد آماستیگوت‌ها

ماکروفاژها روی لامل‌های استریل کشت داده می‌شود سپس پروماستیگوت‌هایی که در فاز ایستایی‌اند به تعداد ۷تا۱۰ برابر ماکروفاژ به هر چاهک اضافه می‌شود. از عصاره‌ی آبی با غلظت های به صورت سری رقیق‌سازی ٦٢,٥ و ١٢٥و ٢٥٠ و ٥٠٠ و ١٠٠٠ و ٢٠٠٠ و ٤٠٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و بعد از اضافه شدن به هر لامل، این آزمایش به صورت تریپلیکیت انجام گرفت. لامل‌ها برای ٢٤ ساعت انکوبه شد.سپس لامل‌ها توسط متانول فیکس و با گیمسا رنگ‌آمیزی شد.لامل‌ها در پایان به منظور شمارش تعداد ماکرفاژ آلوده به انگل وتعداد آماستیگوت‌های موجود در هر ماکروفاژ در تعداد ۱۰۰ ماکروفاژ بررسی می‌شود .

(شاهد منفی (ماکروفاژ و انگل بدون دارو) و شاهد مثبت (ماکروفاژ و انگل درمان شده با گلوکانتیم) است.

بررسی آپوپتوز به وسیله فلوسایتومتری

پروماستیگوتهای مواجه شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی و هم چنین سلول‌های کنترل برای آزمایش فلوسایتومتری مورد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

استفاده قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت سانتریفیوژ شد و مطابق پروتکل به همراه بافر فلوسایتومتری به سلول‌های ته نشین شده λ ۵ محلول Annexin-V و λ ۵ 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 تجزیه و تحلیل شد و به صورت نمودار رشد نمایش داده شد.

شرایط In vivo

روش آلوده‌سازی موش‌های بالب سی با انگل لیشمانیا ماژور و درمان موش‌ها

۰/۱ میلی‌لیتر محلول حاوی انگل، که حاوی ۱۰۶ پروماستیگوت را که در فاز ایستا بود به صورت زیر جلدی، به کمک سرنگ انسولین، در ناحیه قاعده دم موش‌ها تزریق شد، پس از گذشت ٤ تا ۵ هفته از تزریق انگل، گره کوچک سفتی در محل پدید آمد که پس از حدود ۲ هفته به زخم باز تبدیل شد. برای اطمینان از حضور انگل لیشمانیا در زخم، از روش نمونه برداری و مشاهده با لام مستقیم در زیر میکروسکوپ استفاده شد.

آماده سازی پماد

جهت تهیه پماد موضعی میزان ۵ سی سی از محلول استوک اولیه را با ۵ سی سی از پماد وازلین چشمی ترکیب کردیم.

موش‌ها به ٤ دسته ۵ تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

۱.گروه شاهد آلوده بدون درمان.

۲.گروه آلوده تحت درمان با عصاره‌ی آبی گیاه شاهتره (٤۰۰۰ میکروگرم) + وازلین

۳. گروه گلوکانتیم (٦۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) به مدت ۲۸ روز.

٤.گروه درمانی فقط پماد وازلین

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین متغیرهای مطالعه شده در گروه‌های مختلف از روش تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد.

همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به صورت دو به دو بین گروه‌های مختلف از آزمون من ویتنی استفاده شد.

از آزمون کولموگوروف–اسمیرنوف یک نمونه‌ای برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ١٦ استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج In vitro

نتایج حاصل از آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها

پس از گذشت ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت از کشت انگل، شمارش تعداد انگل نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی در مرحله اول و با گذشت زمان تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد، و IC50 درعصاره آبی در ٢٤ ساعت به ترتیب٢١٥٧/٦ در ٤٨ ساعت به ترتیب ۹۷۲/۷٦۹ و در ۷۲ ساعت عبارت است از ۳۰٤/۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتراست.با انجام آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) بین غلظت‌های مختلف عصاره وگروه کنترل اختلاف معنا داری دیده شد (جدول ۱).

نتایج MTT

بیشترین اثر بازدارندگی انگل مربوط به غلظت٤۰۰۰ µ/ml ازعصاره ابی گیاه شاهتره است(جدول۳). کمترین اثر بازدارندگی روی ماکروفاژها مربوط به غلظت٦٢,۵ µ/ ml از عصاره آبی گیاه شاهتره است(جدول ۲).

نتایج فلوسایتومتری

نتایج بررسی عصاره ابی شاهتره در غلظت ۱۰۰۰ µ/ml روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور ١٦٪ مرگ انگل، ۰/۱۱٪ اپاپتوز اولیه، ۰/۱۹٪ آپاپتوز ثانویه، ۰/۲۵٪ نکروز را نسبت به نمودار۱ که نمودار کنترل بدون درمان است و حدود ۹۹/۵ درصد انگل‌ها زنده هستند نشان میدهد نمودار (۲ و ۱) نمودار فلوسایتومتری نمونه انگل بدون مواجهه با عصاره .

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

جدول(۱) میانگین و انحراف معیار تعداد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا تحت تاثیر عصاره آبی گیاه شاهتره در مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت

غلظت بر اساس میکروگرم در میلی لیتر عصاره	میانگین و انحراف معیار پروماستیگوت ها10^4×		
	(۲۴ساعت)	(۴۸ ساعت)	(۷۲ ساعت)
۴۰۰۰	٭۲۰/۷۲ ±۰/۱۲	٭۱۶/۴۱± ۰/۵۰	٭۱۳/۰۷ ± ۰/۴۱
۲۰۰۰	٭۲۸/۳۲ ± ۰/۵۴	٭۲۴/۵۵± ۰ /۴۶	٭۲۱/۴۲ ± ۰/۴۱
۱۰۰۰	٭۳۵/ ۴۷± ۰/۳۸	٭۳۲/۲۷ ±۱/۴۴	٭۳۰/۹۷ ± ۰/۷۱
۵۰۰	٭۴۲/۴۶ ± ۱/۰۴	٭۴۱/۵۷ ± ۰/۴۱	٭۳۹/۷۲ ± ۱/۱۸
۲۵۰	٭۴۹/۱۵ ± ۰/۸۴	٭۴۸/۸۰ ± ۰/۷۹	٭۴۸/۷۰ ± ۱/۳۵
۱۲۵	٭۵۱/۴۲ ± ۱/۲۲	٭۵۳/۸۰ ± ۰/۹۲	٭۵۱/۸۷ ± ۱/۳۷
۶۲/۵	۶۱/۷۷ ± ۱/۲۳	٭۵۶/۳۷ ± ۱/۹۳	٭۵۳/۲۰ ± ۱/۵۱
بدون تاثیر عصاره	3±65	۹۲ ±۷۷/۵۱	۱۲۰±۳۰
امفوتریسین ب	٭۱۰±۵	٭۷±۵	٭۳±۱/۷
گلوکانتیم	٭۹±۲	٭۸±۲	٭۳±۲

** در تمام گروهها اختلاف معنی‌داری بین کنترل و نمونه تحت تاثیر *اختلاف معنی دار آماری با گروه کنترل دیده می شود (p<۰/۰۵).

جدول (۲)میانگین و انحراف معیار و درصد بازدارندگی تأثیر عصاره ابی گیاه شاهتره بر روی پرو ماستیگوت‌ها و ماکروغاژها در آزمون MTT

غلظت بر اساس (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میانگین ± انحراف معیار میزان جذب در پروماستیگوت ها	٪ باز دارندگی	میانگین ± انحراف معیار میزان جذب در ماکروفاژها	٪ باز دارندگی
۴۰۰۰	۰/۳۷ ±۰/۰۳	٭۴۷	۰/۶۶ ± ۰/۱۴	٭۱۲
۲۰۰۰	۰/۴۵±۰/۰۲	٭۳۶	۰/۶۷ ± ۰	٭۱۱/۸
۱۰۰۰	۰/۵۸ ±۰/۰۴	۱۸٭	۰/۶۹ ± ۰/۰۲	٭۹/۲۱
۵۰۰	۰/۶۰ ± ۰/۰۱	٭۱۵	۰/۷۱ ± ۰	٭۶/۵
۲۵۰	۰/۶۳ ± ۰	٭۱۲	۰/۷۳ ± ۰/۰۱	۳/۹
۱۲۵	۰/۶۵ ±۰/۰۱	٭۸	۰/۷۴ ± ۰	۲/۶
۶۲/۵	۰/۶۷ ± ۰/۰۵	٭۵	۰/۷۵ ± ۰	۱/۳
کنترل	۰/۷۱ ±۰/۰۱	۰	۰/۷۶ ± ۰/۱۵	۰
گلوکانتیم	۰/۱۷ ±۰/۰۱	٭۷۷	۰/۳۸ ± ۰	۵۰
آمفوتریسین	۰/۱۸ ± ۰	٭۷۶	۰/۳۶ ± ۰	۵۲

** اختلاف معنی داری بین کنترل و نمونه تحت تاثیر عصاره دیده می شود (p<۰/۰۵).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

جدول (۳) میانگین وانحراف معیار تغییرات قطر زخم ناشی از آلودگی به لیشمانیای ماژور در موش‌های کنترل بدون درمان وتحت درمان

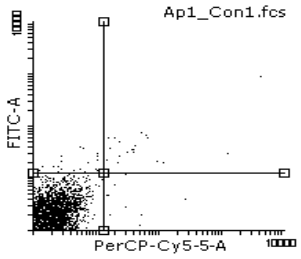
گروه هفته	تحت درمان با عصاره آبی شاهتره ٤(میلی گرم)	گروه کنترلی (بدون درمان)	گروه وازلین	گروه تزریقی گلوکانتیم
اول	۳/٤۲±۰/۱٤	۳/۵۷±۰/۸۸	۳/۵۹±۰/۷٤	۳/۱۳±۰/۲۹
دوم	۳/٤۵±۰/۱۹	۵/۳۹±۰/۷۵	۵/۱۷±۰/۲٤	۳/۱۳±۰/۲۹
سوم	۳/٦۰±۰/۲	۷/٦۱±۰/۸۱	۸/۲۷±۰/۷۲	۳/۱٤±۰/۲۹
چهارم	٤/۲±۰/۲۳	۹/۹۱±۰/٤۰	۱۰±۰/٤۸	۳/۱٤±۰/۲۹

**بین میانگین قطر زخم موشهای آلوده وگروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شده است (p<۰/۰۵).

جدول(٤) تغییرات وزن موش ها در ٤ هفته

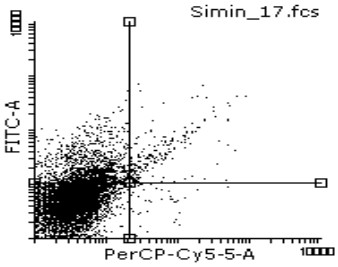
گروه هفته	تحت درمان با عصاره آبی شاهتره ٤(میلی گرم)	گروه کنترلی (بدون درمان)	گروه وازلین	گروه تحت درمان با گلوکانتیم
اول	۳۲/٦٦	۳۲/٦٦	۳۲/٦۵	۳۲/٦٦
دوم	۳۲/٦٦	۳۱/۸	۳۲	۳۲/٦٦
سوم	۳۲/٦۵	۳۱	۳۱/۷	۳۲/٦۹
چهارم	۳۲/٦۳	۳۰/٤	۳۰/۵	۳۲/۷

**بین وزن موش های تحت درمان و وزن موشهای آل وده وگروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شده است (p<۰/۰۵).



	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	99.45
Right Bottom	0.11
Left Top	0.25
Right Top	0.19

نمودار (۱) نمودار فلوسایتومتری نمونه انگل بدون مواجهه با عصاره



	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	84.07
Right Bottom	0.47
Left Top	13.46
Right Top	2.00

نمودار (۲) نمودار فلوسایتومتری انگل مواجهه باغلظت ۱۰۰۰µg/ml عصاره آبی گیاه شاهتره

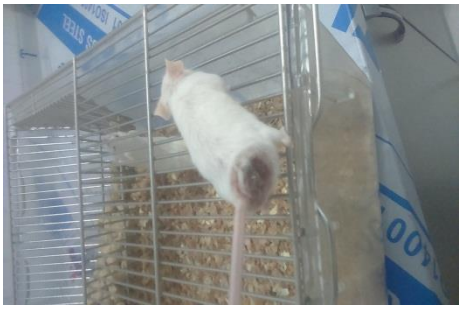
نتایج In vivo

نتایج حاصل از گروه‌های مورد مطالعه

در تمام گروه‌ها، بررسی تا پایان روز ٦۰ (۳۰ روز درمان موضعی و۳۰ روز تعقیب نتیجه درمان و در پایان روز ٦۰ برای سنجش میزان بار انگلی کشته شدند و طحال جدا شد) انجام گرفت. بدین ترتیب که درمان به مدت ۳۰ روز متوالی در زمان معین وهر روز انجام شد. و بعد به منظور سنجش بار انگلی موشهای زنده مانده کشته شدند.

بیشتر موش‌های شاهد بیمار بعداز ٦۰ روز مرده بودند وتنها ۱ موش از۵ سر موش زنده ماند. که آن نیز برای کنترل کبد و طحال آلوده و سنجش بار انگلی کشته شد. گروه شاهد بیمار با گروه‌های تحت درمان از نظر میانگین قطر زخم و میانگین وزن اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) در گروه شاهد میانگین قطر زخم پیوسته در حال افزایش (جدول ۳) (شکل ۳ و ٤)و میانگین وزن هم در هنگام این دوره کاهش چشم‌گیری داشت (جدول ٤).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]



شکل (۳)ا زخم مربوط به گروه کنترل(بدون درمان)

۵ شکل (٤)ا بعداز٤ هفته درمان با عصاره آبی

بحث

مهمترین درمانی که امروزه برای انواع لیشمانیوز به کار می‌رود، ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان هستند که شامل سدیم استیبوگلوکونات(پنتوستام) و مگلومین آنتی‌موانات (گلوکانتیم) می‌شوند. این ترکیبات، بیش از یک قرن است که برای درمان لیشمانیوز به کار 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 طرفی به علت وجود عوارض متعدد دارو (٦-٧)، تلاش برای دستیابی به داروی جدیدی که بتواند ضمن اینکه زخم را سریعتر بهبود بخشد، کمترین عوارض جانبی را داشته باشد و پس از بهبودی، جوشگاهی بر جای نگذارد ادامه دارد. درمان‌های مختلفی برای این بیماری پیشنهاد شده است مانند: سرما درمانی، گرما درمانی، استفاده از داروهای مثل داپسون، ریفامپیسین، کتوکونازول، پاروموماسین موضعی، آمتین، میاکرین، آمفوتریسین ب، آلوپورینول و غیره... اما هیچکدام از موارد ذکر شده روش درمان قاطعی نبوده، و با توجه به آثار جانبی و عوارض ترکیبات آنتی‌موان، و با عنایت به اینکه عصاره‌ی آبی گیاه شاهتره دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد کرمی هستند، و همچنین ضد ویروس بوده است. با توجه به اینکه فوماریا دارای خواص ضد مالاریا و ضد تریپانوزوما (۲۲) است نظر براین شد که از عصاره گیاه شاهتره را در این پژوهش استفاده کنیم.

اندازه زخم: بررسی موش‌های شاهد گروه آلوده بدون درمان نشان می‌دهد که میانگین زخم‌های این گروه که در ابتدای بررسی ۳/۵ میلی‌متر بوده، در مدت هفته‌های متوالی روندی رو به توسعه داشته، به طوری که در روز ۳۰ درمان به مقدار۹ میلی‌متر رسیده است. اما در گروهای تحت درمان با عصاره آبی قطر زخم کمی افزایش یافت اما نسبت به گروه کنترل بدون درمان اختلاف معناداری داشت. آزمون آماری در هفته اول و دوم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد. ولی طبق جدول در هفته‌های بعد معنی‌دار است.

زمان بقا: طبق آزمایش‌های برون تنی و تاثیر عصاره‌ی آبی روی پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت، برای درمان زخم موش‌های Balb/c از آنها استفاده شد اما چون عصاره‌ها به صورت مایع بوده و مصرف آنها سخت بود با استفاده از پماد وازلین، پماد درمانی از عصاره‌ها تهیه شد و روزانه در ناحیه زخم استفاده شد. پیشنهاد می شود برای مطالعه افزایش تاثیرگذاری عصارهها را از روند تزریقی انها در ناحیه زخم هم استفاده شود.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه و کمتر بودن عوارض جانبی عصاره ابی گیاه شاهتره در مقایسه با ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان، می‌توان پیشنهاد داد که پژوهش بیشتری در این زمینه صورت گیرد و از عصاره الکلی این گیاه نیز برای درمان لیشمانیازیس جلدی استفاده کرد. برای اثر بخشی بیشتر آن پیشنهاد میشود به صورت تزریقی یا خوراکی از این عصاره نیزاستفاده شود.

فهرست منابع و مآخذ

1. Alvar, J., D.Ve´lez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One, 7(5): p.e35671.
2. Mohseni, N., et al. (2012). "Natural anti-leishmaniasis compounds in traditional Iranian medicine." Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine 3(1): 41-50.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

3.Ramezani, Y., et al. (2011). "Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Aran and Bidgol from April to September 2009." KAUMS Journal (FEYZ) 15(3): 254-258.
4.Hadighi, R., et al. (2006). "Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant Leishmania tropica parasites." PLoS medicine 3(5).
5.Arevalo, I., et al. (2001). "Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator." Clinical infectious diseases 33(11): 1847-1851.
6.Saebi, E. (2011). "Clinical Parasitology: Protozoal Diseases in Iran." Tehran: Aeeizh.
7.Al-Majali, O., et al. (1997). "A 2-year study of liquid nitrogen therapy in cutaneous leishmaniasis." International journal of dermatology 36(6): 460-462.
8. Kumar, S., et al. (2017). "Fumaria parviflora Lam.(Fumitory): A traditional herbal medicine with modern evidence." Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology 3(6): 200-207.
9. Chauhan, N. S. (1999). Medicinal and aromatic plants of Himachal Pradesh, Indus publishing
10. Orhan, I. E., et al. (2012). "Antioxidant and hepatoprotective activity appraisal of four selected Fumaria species and their total phenol and flavonoid quantities." Experimental and toxicologic pathology 64(3): 205-209.
11. Mozaffarian Vali-Allah, Iranian Crop Names: Latin, English, Persian. Contemporary culture. 1375, page 238.[Persian]
12. 3. Ali's disease, medicinal plants. Seventh Edition. Tehran Institute of Publishing and University. 1997, Volume One, Pages 72 – 166.[Persian]
13. Soušek, J., et al. (1999). "Alkaloids and organic acids content of eight Fumaria species." Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques 10(1): 6-11.
14. Suau, R., et al. (2002). "Direct determination of alkaloid contents in Fumaria species by GC-MS." Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques 13(6): 363-367.
15. Hejazi, S. H., et al. (2009). "Comparison effectiveness of extracts of Thyme, Yarrow, Henna and Garlic on cutaneous leishmaniasis caused by L. major in animal model (Balb/c)." Journal of Medicinal Plants 8(30): 129-160.
16. Nursabaghi, F., et al. (2016). "Evaluation the effect of Rumex alcoholic extract against cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major in Balb/c mice." Razi Journal of Medical Sciences 23(148): 28-35.
17. Asadi, M., et al. (2012). "Effect of hydroalcoholic extracts of Stachys lavandulifolia Vahl and Mespilus germanica leaves on Leishmania major." Hormozgan Medical Journal 15(4): 279-284.
18. Shariatifar, N., et al. (2006). "The study of flos plant on progmastigote in culture." The Horizon of Medical Sciences 11(4): 5-9.
19. Noor Mohammadi H, Maroufi Y, Dabirzadeh M, Miri A, Karimi A. Journal of Medicinal Plants, Year 15, Volume 2, Serial Number 58, Spring 2016.[persian]
20. Naseri Farr, Dalimi A, Ahmadinejad, Investigation of the effect of different concentrations of aqueous extract of monkey plant on the growth of leishmaniasis major in macrophages of rat rat in laboratory conditions. Research Journal of Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Volume 36, Special Issue 1, Winter 2012, pp. 12-18.[persian]
21. Jameel, M., et al. (2014). "Phytochemical investigation of the aerial parts of Fumaria parviflora Lam." Journal of Pharmaceutical and Biosciences B 2: 1-8.
22. Orhan, I. E., et al. (2015). "Antiprotozoal assessment and phenolic acid profiling of five Fumaria (fumitory) species." Asian Pacific journal of tropical medicine 8(4): 283-286.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]