

ارزیابی سایتو توکسیستی و اثرات ضد پلاسمودیومی عصاره های اتانولی و دی کلرومتان بره موم چهار منطقه مختلف ایران

هوشنگ افروزان^۱، اکرم ابوبی مهریزی^۲، محمدعلی شکرگزار^۳، آذر تحقیقی^۴، علی اسحاقی^۵، نوید دین پرست جدید^۶
صدیقه ذاکری^{*}

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، بخش تحقیقات مalaria و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انتیتیو پاستور ایران، تهران، ایران.
- ۲- بخش تحقیقات زنبور عسل، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- استادیار، بخش تحقیقات مalaria و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انتیتیو پاستور ایران، تهران، ایران.
- ۴- استاد، انتیتیو پاستور ایران، بانک سلوی ایران.
- ۵- استادیار، بخش فیزیک و شیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
- ۶- استاد، بخش تحقیقات مalaria و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انتیتیو پاستور ایران، تهران، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۱۲ / تابستان ۹۶ / مسلسل ۷۶

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱/۱۱

پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۱۱

*** مقدمه:** ظهور مقاومت دارویی در برابر انگل مalaria یکی از مشکلات کنترل و حذف مalaria در جهان محسوب می شود. لذا در این تحقیق به منظور خلبه بر مقاومت دارویی بره موم چهار منطقه متفاوت ایران از نظر سایتو توکسیستی و خواص ضد پلاسمودیومی بررسی شد.

*** مواد و روش ها:** بره موم های ایران از چهار منطقه مختلف جمع آوری و با حلال های اتانول ۷۰٪ و دی کلرومتان عصاره گیری شدند. سایتو توکسی عصاره های بره موم با روش MTT بر روی سلول فیبروبلاست ۹۲۹ بررسی و اثرات ضد پلاسمودیومی عصاره های مختلف بره موم در شرایط درون تنی بر روی موش های نیزاد BALB/c بررسی شد.

*** یافته ها:** عصاره اتانولی و دی کلرومتان بره موم های چهار منطقه مختلف ایران در دوز های ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml غیر سمی بودند. بیشترین درصد مهار رشد انگل Plasmodium berghei با ۷۱ و ۶۵ درصد به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی و دی کلرومتان بره موم منطقه مرادیگ بود.

*** بحث و نتیجه گیری:** با توجه به وجود مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم به داروهای رایج و با توجه به خطرات بروز اپیدمی ناشی از این مقاومت دارویی و اهمیت یافتن و توسعه داروهای مؤثر، ارزان و بی خطر در برنامه های کنترل و حذف بیماری مalaria، پیشنهاد می شود خاصیت ضد پلاسمودیومی بره موم های ایران در تحقیقات تكمیلی مورد بررسی بیشتری قرار گیرند.

*** واژه های کلیدی:** ایران، بره موم، سایتو توکسیستی، ضد پلاسمودیوم.

* آدرس مکاتبه: تهران، انتیتیو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش تحقیقات مalaria و ناقلین.

پست الکترونیک: zakeris@yahoo.com

مقدمه

دنیا با یکدیگر متفاوت می‌باشد (۱۶)، نتایج اثر سمتی بره موم‌های یک منطقه قابل تعمیم به سایر مناطق نبوده و بررسی اثرات سایوتوكسیسیتی بره موم‌های مناطق مختلف دنیا به صورت مجزا مورد ارزیابی قرار گرفته شده است (۱۷). در ارتباط با اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم در شرایط درون تنی تحقیقات بسیار محدودی گزارش شده است (۱۸، ۱۹). با توجه به اینکه تاکنون واکسن مؤثربالیه بیماری مالاریا تولید نشده و در واقع رسیدن به این واکسن به زودی امکان پذیر نمی‌باشد، در شرایط کنونی استفاده از دارو علیه انگل جهت مقابله با این بیماری بسیار مورد توجه می‌باشد. از سوی دیگر استفاده مکرر از داروی کلروکین در طی سال‌های متتمادی موجب بروز ایجاد مقاومت دارویی در انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم شده است. متأسفانه گزارشات حاکی از کاهش حساسیت و بروز مقاومت به آرتمیزین در سویه‌های فالسیپاروم در کشورهای کامبوج، تایلند، میانمار و ویتنام می‌باشد که ممکن است این مقاومت به سایر مناطق آندمیک جهان از جمله ایران گسترش یابد (۲۰، ۲۱). در شرایط کنونی داروی ضد مالاریایی در حد مشتقات آرتمیزین برای جایگزین شدن وجود ندارد (۲۱). ضمن آنکه داروهای ضد مالاریایی جدید گران بوده و درنتیجه در آینده نزدیک کنترل و حذف بیماری مالاریا با مشکل مواجه خواهد شد. لذا آزمایشگاه‌های متعددی در جهان درصد تولید و دست یافتن به یک داروی مؤثر، ارزان و بی‌خطر به خصوص برای کودکان و زنان باردار مبتلا به مالاریا هستند. بره موم یکی از ترکیبات طبیعی ارزان قیمت و بدون عوارض است که در برخی مطالعات خواص ضد پلاسمودیومی آن گزارش شده است (۲۲). ولی این خاصیت تحت تأثیر پوشش گیاهان مورد استفاده زنبور عسل و همچنین نوع حلال مورد استفاده برای استحصال بره موم قرار داشته و عصاره اتانولی بره موم بهتر از عصاره آبی آن اثرات ضد مالاریایی ایجاد کرده است (۲۲). با توجه به اینکه رنگ و عطر بره موم در مناطق مختلف متفاوت بوده و ویژگی‌های کیفی ترکیبات آن

بره موم یکی از تولیدات زنبور عسل می‌باشد که در دنیا به عنوان داروی طبیعی ضد باکتری و ضد قارچ (۱)، ضدویروس (۲)، ضد التهاب و زخم (۳)، ضد انگل مالاریا (۴) و لیشمانیا (۵)، ضد تومور (۶)، آنتی‌اکسیدان (۷) و تقویت کننده سیستم ایمنی (۸) گزارش شده است. برای تولید آن زنبوران مسن یا چرایی ابتدا تکه‌های رزین یا صمغ تراوش شده از جوانه گیاهان را به وسیله پاهای عقب و قطعات دهانی جدا کرده سپس آنها را در داخل سبد گردید در پاهای عقبی قرار داده و به کندو حمل و پس از ترکیب با موم آن را به بره موم تبدیل می‌کنند (۹). بره موم به‌طور متوسط از ۵۰-۵۵٪ صمغ یا رزین، ۳۰-۴۰٪ موم، ۱۰٪ روغن‌های ضروری یا فرار، گرده، ترکیبات آلی و مواد معدنی ۵٪ تشکیل شده است (۱۰). بیش از ۳۰۰ نوع ترکیب مختلف در بره موم گزارش شده است که مهم‌ترین ترکیبات آن شامل ترکیبات فلزی مانند فلاونوئیدها، ترپن‌ها و روغن‌های فرار می‌باشد (۱۱). فلاونوئیدها یکی از ترکیبات مهم بره موم می‌باشد که نقش اساسی در فعالیت بره موم ایفا می‌کنند به طوری که باعث کشتن و یا بازدارندگی گستره وسیعی از باکتری‌ها و برخی از پاتوژن‌های تکیاخته‌ای می‌شوند (۱۲). اثرات سایوتوكسیسیتی عصاره اتانولی بره موم تایلند بر روی برخی از سلول‌های سرطانی به دلیل فلاونوئیدهای موجود در آن می‌باشد (۱۳). با توجه به اینکه ترکیبات و فلاونوئیدهای موجود در بره موم نواحی مختلف با یکدیگر متفاوت می‌باشد ضروری است که ترکیبات فلاونوئیدهای موجود در بره موم‌های هر منطقه تعیین شود. از طرفی بررسی اثرات توکسیسیتی بره موم‌ها قبل از استفاده از آنها در مصارف مختلف اعم از دارو درمانی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. گزارشات محدودی در مورد بررسی اثرات سمی بره موم در شرایط برون تنی منتشر شده که مربوط به دو گزارش بررسی سایوتوكسیسیتی بره موم‌های کوبا و لیبی می‌باشد (۱۴، ۱۵). با توجه به اینکه ترکیبات بره موم مناطق مختلف

خشک کردن عصاره‌های صاف شده، در روتاری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی اثر سایتو توکسیسیتی عصاره‌های بره موم بر روی سلول فیبروبلاست L929 موش:
کشت سلول فیبروبلاست موش L929

سلول‌های فیبروبلاست رده 161 NCBI L929 موش از بانک سلولی انسنتیتو پاستور ایران دریافت گردید. سلول‌ها در محیط کشت RPMI (دارای پنی‌سیلین و اریتروماسین مقدار $100\text{ }\mu\text{g/ml}$) از هر کدام و ال‌گلوتامین/اگلوتامکس (Memmert, Germany) با دمای 37°C و رطوبت $5\text{ CO}_2\text{/}\%$ نگهداری شدند. حدود ۴۸ ساعت پس از رشد، سلول‌ها پاساژ داده شده و مجدد در انکوباتور قرار داده شدند.

شمارش سلول فیبروبلاست

جهت شمارش سلولی، با توجه به مقدار سلول فیبروبلاست رشد کرده حدود ۲ الی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم به آن اضافه شد (حجم اولیه). سپس حجم 1 ml از تریپان‌بلو 2.5 \% و همان حجم از سلول‌های فیبروبلاست با هم مخلوط و به آرامی پیپتاژ شد. در حدود 20 ml از سوسپانسیون تهیه شده روی لام نئوبار زیر لامل ریخته و تعداد سلول‌های زنده (سلول‌های مرده در اثر رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ آبی دیده می‌شوند) در هر چهار سری خانه‌های شانزده‌تایی در زیر میکروسکوپ شمارش و میانگین گرفته شد ($26, 27$).

تست MTT

جهت انجام تست MTT (دی‌متیل تیازول دی‌فیل تترازولیوم بروماید)، تعداد ۱۰ هزار سلول فیبروبلاست موش L929 به داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی تخلیه و مقدار 1 ml عصاره‌های بره موم در دوزهای مختلف $\mu\text{g/ml}$ $25, 25, 50, 100, 200, 400$ و 800 در ۵ تکرار به سلول‌ها اضافه شد. در چاهک کنترل اول

وابستگی کامل به نوع گیاهان موجود در هر منطقه داشته و در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد (۲۳-۲۵)، لذا در این تحقیق عصاره‌های اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم چهار منطقه دارای پوشش گیاهی متفاوت ایران از استان‌های البرز، همدان، خراسان رضوی و گلستان جمع‌آوری و از نظر سمیت بر روی سلول فیبروبلاست L969 موش بررسی و خواص ضد پلاسمودیومی آنها برای نخستین بار در ایران بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بره موم

بره موم‌ها از چهار منطقه مختلف کشور شامل استان‌های البرز (طالقان) منطقه کوهستانی با پوشش گیاهی Ferula avina (چناران) منطقه مرتعی با پوشش گیاهی Juniperus polycarpus و گلستان (کلاله) منطقه جنگلی با پوشش گیاهی Populous spp و Prunusavium spp در پاییز ۹۳ از کلنی‌های زنبور عسل (Apis mellifera) جمع‌آوری شد.

عصاره‌گیری بره موم

بره موم‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فریزر قرار داده شده و با بوته چینی پودر شدند. بهمنظور جدا کردن موم موجود در بره موم مقدار 3 g از بره موم هر چهار منطقه مورد مطالعه با 100 ml هگزان مخلوط شده و به مدت ۳ روز در دمای 30°C درجه سانتی‌گراد در داخل شیکر با دور 120 rpm قرار داده شد. عصاره‌ها را از کاغذ صافی واتمن 42 عبور داده و مواد باقیمانده بر روی کاغذ صافی در زیر هود خشک شد. مقدار 3 g از بقایای خشک شده هر منطقه با 10 ml از حلال‌های اتانول 70 \% و دی‌کلرومتان در ارلن‌های جداگانه مخلوط شدند و به مدت ۳ روز در دمای 30°C درجه سانتی‌گراد در داخل شیکر با دور 120 rpm قرار داده شدند. عصاره‌ها را از کاغذ صافی واتمن 42 عبور داده و جهت

حجم ۲۰۰ میکرولیتر رقیق و به صورت درون صفاقی به موش‌های گروههای درمان و کنترل تزریق شد (۱۸). گروهها در ۵ تکرار (۵ سر موش در هر قفس) شامل عصاره‌های بره موم اتانولی و دی‌کلرومتان با ۳ دوز مجزا شامل mg/kg BW (۲۵ mg/kg BW) و ۱۰۰ و ۲۰۰، کنترل دارویی (کلروکین) (کلروکین ۲۵ mg/kg BW) و کنترل بدون دارو شامل (pH: 7.2) PBS ۱× و کنترل حلال PBS و کنترل خون‌های آلووده (روز اول درمان (D0)، درمان با تزریق خون‌های آلووده (روز اول درمان (D0)، درمان با عصاره‌های بره موم و کلروکین با غلظت‌های ذکر شده به صورت درون صفاقی با حجم ۱ ml به هر موش تزریق شد. درمان روزی یکبار تا ۵ روز (D0-D4) ادامه یافته و روزانه تزریق انجام شد. در این مدت، خونگیری از دم موش‌ها و تهیه اسمیر برای تعیین درصد پارازیتمی تمامی گروههای مختلف انجام شد. بررسی میزان پارازیتمی و بقا موش‌ها به مدت ۲۸ روز (D27) ارزیابی و ثبت شد. محاسبه میزان مهار رشد در گروههای درمان و کنترل به شرح زیر انجام شد:

$$\frac{\text{میزان پارازیتی در گروه درمان} - \text{میزان پارازیتی در گروه کنترل}}{\text{میزان پارازیتی در گروه کنترل}} \times 100 = \text{درصد مهار رشد}$$

آنالیز آماری

جهت آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS 20 استفاده شد. مقایسه میانگین درصد پارازیتمی موش‌های تحت بررسی در گروههای مختلف، با روش One way ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار مقایسه تیمارها از طریق آزمون Tukey در سطح معنی‌داری ۰.۵% انجام شد ($P < 0.05$). برای مقایسه بقا موش‌ها، میانه تعداد روزهای بقا موش‌ها با روش منحنی کاپلان مایر انجام شد.

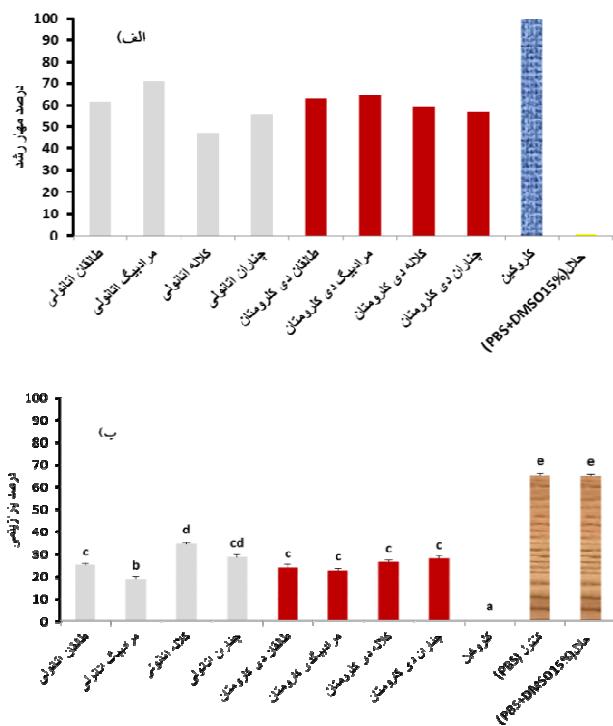
آنالیز عصاره‌های بره موم با روش GC-MS

به منظور تعیین فلاونوییدهای عصاره‌های اتانولی و دی‌کلرومتان مناطق مختلف از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent 6890N مجهز شده به اسپکتروفوتومتر جرمی Agilent Technology 5975C و محفظه تزریق انشعابی/غیر انشعابی و سیستم نمونه‌گیر خودکار COMBI PAI (CTC) (pH: 7.2) در

فقط سلول و محیط کشت حاوی سرم ۱۰٪ و در چاهک کنترل دوم سلول و محیط کشت حاوی سرم ۱۰٪ و حلال عصاره بره موم (۱٪ DMSO) اضافه شد. کلیه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها تخلیه و مقدار ۱۰۰ μl MTT با غلظت ۰.۵ mg/ml به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس رنگ MTT را خارج نموده و مقدار ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در شیکر قرار داده شد. OD نمونه‌ها در طول موج ELX808، ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاریدر (USA) خوانده شد مقدار IC50 با رسم منحنی و بر اساس دوزهای هر عصاره و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. دوز عصاره‌های بره موم هر منطقه که درصد سلول‌های زنده فیبروبلاست را به کمتر از ۳۰٪ کاهش دهد دوز سمی محاسبه می‌شود (۲۸).

بررسی اثرات آنتی پلاسمودیومی عصاره‌های بره موم بر روی موش c BALB به منظور بررسی اثر ضد پلاسمودیومی عصاره‌های بره موم از سویه حساس به کلروکین (هیدیه گرفته شده از Plasmodium berghei ANKA دانشکده بهداشت دانشگاه تهران) استفاده شد. برای تست، موش‌های BALB/c ماده با سن ۶ الی ۸ هفتگه از انسستیتو پاستور ایران تهیه و در حیوان خانه با شرایط ۱۲ ساعت خاموشی و ۱۲ ساعت روشنایی در دمای حدود ۲۲ درجه و رطوبت حدود ۱۵٪ نگهداری شدند. به منظور پاساژ انگل، مقدار ۱ ml از خون حاوی انگل (۱× ۱۰⁷ گلولول فرمز آلووده)، در دو مرحله متوالی به صورت داخل صفاقی به ۳ موش تزریق شد. پس از گذشت حدود ۵ روز از آخرین تزریق، زمانی که پارازیتمی موش‌های آلووده حدود ۳۰٪ رسید، تمامی موش‌ها قطع نخاع و از قلب آنها خونگیری انجام شد. خون این موش‌ها برای آلووده کردن موش‌ها و ارزیابی اثرات ضد پلاسمودیومی عصاره‌های بره موم استفاده شد. خون‌های آلووده به انگل با بافر (pH: 7.2) در

عصاره دی کلرومتان بره موم در دوزهای مذکور به ترتیب با ۵۹/۳، ۶۲ و ۶۵ درصد مربوط به منطقه مرادبیگ بود. به طور کلی بیشترین درصد مهار رشد در تمامی بره موم های مناطق مورد مطالعه مربوط به دوز 200 mg/kg BW و در روز ۷۱ یازدهم پس از درمان بود. عصاره اتانولی مرادبیگ با درصد مهار رشد انگل با اختلاف معنی دار پس از کلروکین مؤثرتر از سایر عصاره های بره موم بود ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱ الف و ب). در این بررسی درصد مهار رشد کنترل دارویی (کلروکین) با ۱۰۰٪ مهار رشد انگل با اختلاف معنی دار بهتر از سایر عصاره های بره موم بود ($P < 0.05$).



نمودار ۱. مؤثرترین درصد مهار رشد (الف) و درصد پارازیتمی (ب) انگل پلاسمودیوم برگئی، عصاره های بره موم مناطق مختلف ایران در دوز 200 mg/kg BW بر روی موش های نژاد BALB/c در دهمین

روز پس از آغاز درمان (D9)

بیشترین مدت بقا، موش ها پس از آلوده شدن به انگل مربوط به دوز 200 mg/kg BW بود. میانه ماندگاری موش هایی که با عصاره های دی کلرومتان بره موم مناطق مرادبیگ، طالقان، کلاله و چناران درمان شده بودند به ترتیب ۲۶، ۲۵، ۲۳ و ۲۲ روز و میانه ماندگاری موش های درمان

Analytics موجود در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها

نتایج تست سایتو توکسیسیتی در جدول شماره ۱ نشان می دهد که کلیه عصاره اتانولی و دی کلرومتان بره موم مناطق مذکور در مقایسه با IC50 همان منطقه تا دوز 200 µg/ml اثر سمی بر روی سلول های فیبروبلاست زنده L929 نداشتند. در حالی که تمامی عصاره های بره موم مناطق مورد بررسی در دوزهای 400 µg/ml و 800 µg/ml موجب کاهش تعداد سلول های فیبروبلاست زنده L929 به $\approx 30\%$ و کمتر شده و در این دوزها سمی بودند (۲۸).

جدول ۱. نتایج تست سایتو توکسیسیتی بره موم های چهار منطقه

مختلف ایران بر روی سلول فیبروبلاست L929

میانگین ± انحراف معیار (سلول های فیبروبلاست L929)					
عصاره	دوز $\mu\text{g/ml}$	خراسان رضوی (چناران)	گلستان (کلاله)	همدان (مرادبیگ)	البرز (طالقان) IC50=۲۱ $\mu\text{g/ml}$
اتانول					
	-/۱۵±۰/-۰.۲۴	-/۱۴۵±۰/-۰.۲۴	-/۱۱۲±۰/-۰.۱۶	-/۱۲۷±۰/-۰.۱۴	*۸۰..
	-/۳۵۵±۰/-۰.۱۶۵	-/۱۸۷±۰/-۰.۴۷	-/۱۷۰±۰/-۰.۱۷	-/۲۵۰±۰/-۰.۵۱	*۴۰..
	-/۱۸۸±۰/-۰.۲۹	-/۷۴۴±۰/-۰.۵۶	-/۶۴۸±۰/-۰.۵۱	-/۴۵۹±۰/-۰.۴۰	۲۰۰
	-/۹۱۱±۰/-۰.۲۷	-/۸۸۵±۰/-۰.۲۷	-/۷۴۱±۰/-۰.۱۹۷	-/۷۷۱±۰/-۰.۶۹	۱۰۰
	-/۹۲۷±۰/-۰.۲۶	-/۹۵۱±۰/-۰.۲۶	-/۸۶۸±۰/-۰.۳۱	-/۷۹۴±۰/-۰.۳۷	۵۰
	-/۱۵۴±۰/-۰.۱۸	-/۹۵۴±۰/-۰.۱۰	-/۸۹۷±۰/-۰.۳۴۱	-/۸۴۷±۰/-۰.۳۹۸	۲۵
	-/۱۰۹±۰/-۰.۱۹	-/۹۷۸±۰/-۰.۳۹	-/۹۴۸±۰/-۰.۴۸	-/۸۷۴±۰/-۰.۵۸	کنترل
	-/۸۶±۰/-۰.۲۵	-/۷۵۰±۰/-۰.۲۸	-/۱۳۳±۰/-۰.۱۵	-/۱۳۱±۰/-۰.۳۴	*۴۰..
	-/۱۱۸±۰/-۰.۲۳	-/۹۷۰±۰/-۰.۴۷	-/۸۱۸±۰/-۰.۳۵	-/۹۳۲±۰/-۰.۱۷	*۴۰..
	-/۸۸۶±۰/-۰.۱۳	-/۷۵۱±۰/-۰.۵۶	-/۷۱۷±۰/-۰.۴۳	-/۸۳۲±۰/-۰.۸۴	۲۰۰
	-/۸۶۳±۰/-۰.۲۱۸	-/۸۵۲±۰/-۰.۲۴	-/۸۳۱±۰/-۰.۱۶	-/۸۹۶±۰/-۰.۲۷	۱۰۰
	-/۸۶۶±۰/-۰.۲۳	-/۹۷۷±۰/-۰.۵۸	-/۸۷۵±۰/-۰.۶۱	-/۹۳۱±۰/-۰.۳۱	۵۰
	-/۱۸۷±۰/-۰.۲۸	-/۹۸۱±۰/-۰.۲۸	-/۹۲۰±۰/-۰.۱۲	-/۹۳۹±۰/-۰.۴۵	۲۵
	-/۹۰۸±۰/-۰.۳۵	-/۱۰۶±۰/-۰.۰	-/۹۴۳±۰/-۰.۷۹	-/۹۶۱±۰/-۰.۱۷	کنترل
	-/۱۲۵±۰/-۰.۲۴	-/۱۸۴±۰/-۰.۰۵	-/۱۳۵±۰/-۰.۱۵	-/۱۶۱±۰/-۰.۰۹	*۸۰..
	-/۱۵۶±۰/-۰.۱۲	-/۱۸۷±۰/-۰.۰۳	-/۱۷۱±۰/-۰.۳۵	-/۱۳۸±۰/-۰.۳۴	*۴۰..
	-/۷۷۴۲±۰/-۰.۴۷	-/۷۷۷۲±۰/-۰.۲۹	-/۷۱۰±۰/-۰.۶۷	-/۶۸۷±۰/-۰.۷۰	۲۰۰
	-/۷۳۰۲±۰/-۰.۲۵	-/۷۸۶±۰/-۰.۷۱	-/۸۱۶±۰/-۰.۷۳	-/۸۱۹±۰/-۰.۵۵	۱۰۰
	-/۷۳۱±۰/-۰.۴۸	-/۸۴۱±۰/-۰.۷۱	-/۸۴۷±۰/-۰.۵۶	-/۸۴۴±۰/-۰.۷۵	۵۰
	-/۷۷۴۲±۰/-۰.۷	-/۹۲۱±۰/-۰.۱۲	-/۹۲۲±۰/-۰.۳۰	-/۹۰۴±۰/-۰.۱۲	۲۵
	-/۹۴۴±۰/-۰.۳۵	-/۱۶۹±۰/-۰.۰۵	-/۹۳۸±۰/-۰.۷۹	-/۹۵۸±۰/-۰.۱۷	کنترل

*توكسيك

بررسی خواص ضد پلاسمودیومی بره موم در شرایط درون تنی نشان داد که بیشترین درصد مهار رشد انگل در عصاره اتانولی بره موم در دوزهای $W/B 1/65/66/71$ و 200 mg/kg BW به ترتیب با ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۲۰٪ درصد مربوط به منطقه مرادبیگ بود. همچنین بیشترین درصد مهار رشد انگل در

تعداد سلول‌های زنده فیبروبلاست را به کمتر از ۳۰٪ کاهش دادند، توکسیک بودند (۲۸). در بررسی سایوتوكسیسیتی عصاره‌های اتانولی ۹٪ بره موم که از ۹ استان مختلف در BALB/c کوبا جمع‌آوری و بر روی سلول‌های فیبروبلاست ۳T3 و A31 Vero cells انجام شد، دامنه سمیت عصاره‌های بره موم بین $IC_{50}=54/61\text{ }\mu\text{g/ml}$ و $IC_{50}=100\text{ }\mu\text{g/ml}$ شد (۲۶). همچنین میزان سایوتوكسیسیتی عصاره اتانولی بره موم‌های لبی که از ۶ استان مختلف جمع‌آوری و روی سلول‌های فیبروبلاست U937 تست شده بود بین $35\text{ }\mu\text{g/ml}$ الی $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ گزارش شد (۱۴). اگرچه نوع سلول مورد استفاده در این دو مطالعه یکسان نمی‌باشد و با سلول فیبروبلاست ایران تفاوت دارد ولی مقایسه نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌های بره موم‌های اتانولی، اتیل استات و دی‌کلرومتان مناطق مختلف ایران در مقایسه با بره موم‌های کوبا و لبی سمیت کمتری دارد. یکی از عوامل این تفاوت شاید مربوط به تفاوت‌های اقلیمی و پوشش گیاهی مورد استفاده زنبور عسل باشد (۱۶) که البته به تحقیقات بیشتر در این زمینه نیاز می‌باشد. در ارتباط با اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم تحقیقات چندانی در دنیا انجام نشده است. ویجایانت و همکاران در بررسی اثر ضد پلاسمودیومی بره موم کشور تایلند گزارش کردند که بره موم در تقویت سیستم ایمنی و مهار رشد انگل پلاسمودیوم برگئی مؤثر واقع شده و میزان پارازیتمی را کاهش داده بود (۲۹). سیامسودین و همکاران اثر ضد پلاسمودیومی و ایمنی زایی عصاره هیدروالکلی ۱۰٪ بره موم منطقه جاوا در کشور اندونزی را در غلظت‌های g/kg بررسی کردند که با انگل پلاسمودیوم برگئی آلوده و پس از گذشت ۳ روز با عصاره‌های بره موم در روزهای (D0-) (D4) به صورت خوارکی درمان شدند. آنها گزارش کردند که بره موم جاوا خواص ایمنی زایی قوی‌تر نسبت به خاصیت آنتی پلاسمودیومی آن در مosh‌ها ایجاد کرده و این موضوع باعث افزایش طول عمر موش‌ها شده بود (۱۹). اثر ضد

شده با عصاره اتانولی بره موم مناطق مرادبیگ، طالقان، کلاله و چناران به ترتیب با ۲۳، ۲۵ و ۲۶ روز با اختلاف معنی‌دار از موش‌های کنترل منفی (PBS) بدون درمان که میانه ماندگاری آنها ۱۳ روز بود طول عمر بیشتری داشتند ($P=0.003$). موش‌هایی که با کلروکین درمان شده بودند تا پایان زمان بررسی ۲۸ روز و پس از آن زنده بودند. نتایج آنالیز عصاره‌های بره موم با دستگاه GC-MS بیانگر آن است که استفاده از حلال دی‌کلرومتان برای عصاره‌گیری از بره موم‌ها موجب افزایش استحصال فلاونوپیدها نسبت به عصاره اتانولی آنها شده است. به طوری که مهمترین فلاونوپید شناسایی شده در عصاره اتانولی بره موم‌های ایران Pinostrobin chalcone بود، در حالی که در عصاره دی‌کلرومتان بره موم‌های ایران علاوه بر فلاونوپیدها موجود در عصاره اتانولی فلاونوپیدهای مهم Pinocembrin و Tectochrysin شناسایی شد.

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت دارویی ایجاد شده برعلیه داروهای ارزان، ایمن و طبیعی همانند کلروکین و سولفادوکسین پیریمتامین از مهمترین چالش‌های پیش رو در مسیر کنترل و حذف بیماری مalaria در جهان محسوب می‌شود (۲۴، ۲۵). با توجه به اینکه منشاء تمامی داروهای مؤثر در درمان مalaria گیاهی هستند، برای یافتن داروهای ضد مalaria ایمن و طبیعی این تحقیق طراحی و خواص ضد مalaria ایمنی و سایوتوكسیسیتی بره موم چهار منطقه ایران با پوشش گیاهی متفاوت ارزیابی شد. نتایج تست سایوتوكسیسیتی در جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که کمترین دوز عصاره بره موم که تعداد سلول‌های زنده فیبروبلاست را 50% درصد کاهش داده است مربوط به عصاره اتانولی گلستان با $IC_{50}=216\text{ }\mu\text{g/ml}$ می‌باشد (جدول ۱). لذا کلیه عصاره‌های بره موم‌های مناطق طالقان، مرادبیگ، کلاله و چناران تا دوز $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ غیرتوکسیک (تعداد سلول‌های زنده فیبروبلاست بالاتر از 50% داشتند) و در دوزهای $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ و $800\text{ }\mu\text{g/ml}$ که

ایران فلاؤنوبیدهای مهم Pinostrobin و chalcone که دارای اثرات ضد میکروبی هستند وجود دارد (۳۲). علاوه بر فلاؤنوبیدهای سایر ترکیبات موجود در بره موم مانند ترپن‌ها نیز در ایجاد اثرات ضد میکروبی بره موم مؤثر می‌باشند (۳۳). نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که تنها فلاؤنوبیدهای در ایجاد اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم‌های ایران مؤثر نبودند. از آنجاییکه اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم ناشی از فلاؤنوبیدهای همچنین ترپن‌های موجود در آن می‌باشد (۳۴)، شناسایی ترکیبات مؤثر ایجادکننده اثرات ضد پلاسمودیومی در بره موم‌های ایران نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. درنهایت با توجه به وجود مقاومت دارویی پلاسمودیوم فالسیپاروم به داروهای رایج و در حال استفاده و با توجه به خطرات بروز اپیدمی ناشی از این مقاومت دارویی و اهمیت یافتن و توسعه داروهای مؤثر، ارزان و بی‌خطر در برنامه‌های کنترل و حذف بیماری، شاید بتوان با نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات مشابه قبلی بره موم را به عنوان یک داروی ضد مalariaی به تنها و یا به صورت ترکیبی با سایر داروهای ضد malariaی در حال استفاده مورد توجه قرار داد تا بتوان بر این بیماری عفونی کشنده که مانع از رشد اقتصادی کشورهای درگیر است، غلبه یافت. نقطه قوت این تحقیق استفاده از بره موم‌های مناطق مختلف ایران با آب و هوا و پوشش گیاهی متنوع و همچنین مقایسه حلال‌های مختلف برای استحصال بره موم بود که برای نخستین بار در ایران انجام شد. ادامه تحقیق و جداسازی ترکیبات مؤثره بره موم برای بررسی اثرات ضد پلاسمودیومی هریک از آنها تکمیل کننده این تحقیق می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های جناب آقای مهندس مرتضی مهرجویی در مراحل بررسی سایوتوكسیسیتی بره موم‌ها و انستیتو پاستور ایران به خاطر حمایت‌های اجرایی و مالی تشکر می‌گردد.

پلاسمودیومی عصاره مтанولی بره موم کشور تانزانیا برعلیه انگل پلاسمودیوم برگئی بر روی تعداد ۱۵ موش طبق روش Rane مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸). بدین منظور تعداد ۱۵ موش به سه گروه ۵ تایی در هر قفس تقسیم شدند و روزانه به تمامی گروه‌ها شامل کنترل منفی (نرمال سالین)، عصاره مтанولی بره موم با دوز 600 g/kg و کنترل مثبت (کلروکین) داده شد. بر اساس این گزارش کلروکین با $13/55\%$ و عصاره مтанولی بره موم با $25/8\%$ پارازیتمی با اختلاف معنی‌دار بهتر از کنترل منفی (نرمال سالین) با $35/8\%$ پارازیتمی بودند ($P < 0.05$). استفاده از عصاره مтанولی بره موم عربستان در دوزهای 25 mg/kg , 50 mg/kg , 100 mg/kg در دوزهای 7 روز بر روی موش‌های آلوده به انگل پلاسمودیوم مدت 7 روز بر روی طحال موش‌ها داشته و برگئی اثرات محافظت کننده بر روی طحال موش‌ها نسبت به باعث کاهش معنی‌دار درصد پارازیتمی موش‌ها نسبت به کنترل شده و موجب افزایش سایوتوكاین‌های TNF- α , IFN- γ , G-CSF و GM-CSF در دوز 100 mg/kg BW گردید (۴). گرچه تفاوت در مطالعات ذکر شده از نظر نوع بره موم و همچنین نحوه کاربرد بره موم که به موش‌ها گاوaz کردند، با بره موم‌های ایران که به موش‌ها تزریق شد وجود دارد، ولی نتایج تمامی مطالعات مشابه تحقیق حاضر بیانگر آن است که بره موم می‌تواند با کاهش درصد پارازیتمی و افزایش درصد مهار رشد انگل مalaria باعث افزایش طول عمر موش‌ها شود. بدین ترتیب بره موم می‌تواند به عنوان یک گزینه در توسعه داروهای جدید ضد پلاسمودیومی مطرح باشد که البته نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد. در تحقیق حاضر با توجه به اهمیت فلاؤنوبیدهای موجود در بره موم که می‌تواند خواص بیولوژیکی بره موم را سبب شود (۳۱,۳۰)، میزان فلاؤنوبیدهای عصاره‌های اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم مناطق مختلف با GC-MS آنالیز و مقایسه شدند. نتایج نشان داد که استفاده از عصاره‌های دی‌کلرومتان بره موم موجب استحصال فلاؤنوبیدهای بیشتری نسبت به عصاره اتانولی بره موم‌ها شده است. همچنین در عصاره‌های بره موم

References

- Wieczynska A, Wezgowic J, Wiciewicz W, Czarny A, Kulbackas J, Nowakowska D, et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and total phenolic content of different extracts of propolis from the west Pomeranian region in Poland. *Drug Res.* 2017; 74(2): 715-722.
- Yildirim A, Duran GG, Duran N, Jenedi K, Bolgul BS, Miraloglu M, et al. Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Med Sci Monit.* 2016; 22: 422-430.
- Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Casarin RCV, Alencar SM, Rosalen PL, et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *J Ethnopharmacol.* 2017; 207: 100-107.
- AlGabbani Q, Mansour L, Elnakady YA, Al-Quraishy S, Alomar S, Al-Shaebi EM, et al. In vivo assessment of the antimalarial and spleen-protective activities of the Saudi propolis methanolic extract. *Parasitol Res.* 2017; 116(2): 539-547.
- Nina N, Lima B, Feresin GE, Giménez A, Salamanca Capusiri E, Schmeda-Hirschmann G. Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 62(3): 290-296.
- Alizadeh AM, Afrouzan H, Dinparast-Djadid N, Sawaya AC, Azizian S, Hemmati HR, et al. Chemoprotection of MNNG-initiated gastric cancer in rats using Iranian propolis. *Arch Iran Med.* 2015; 18(1): 18-23.
- Xavier JA, Valentim IB, Camatari FOS, de Almeida AMM, Goulart HF, Ferro JNS, et al. Polyphenol profile by UHPLC-MS/MS, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of Brazil. *Pharm Biol.* 2017; 55(1): 1884-1893.
- Soltani EK, Cerezuela R, Charef N, Mezaache-Aichour S, Esteban MA, Zerroug MM. Lgerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 62: 57-67.
- Meyer W. Propolis bees and their activities. *Bee World.* 1956; 37: 25-36.
- Pujrahayu N, Ritonga H, Uslinawaty Z. Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *J Pharm Sci.* 2014; 6(6): 338-340.
- Marcucci MC. Propolis, Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie.* 1995; 26: 83-99.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(2): 167-202.
- Bufalo MN, Candeias JMG, Sousa JPB, Bastos JK, Sforci JM. In vitro cytotoxic activity of Baccharis dracunculifolia and propolis against HEp-2 cells. *Nat Prod Res.* 2010; 24(18): 1710-1718.

14. Siheri W, Zhang T, Ebiloma GU, Biddau M, Woods N, Hussain MY, et al. Chemical and Antimicrobial Profiling of Propolis from Different Regions within Libya. *PLoS One.* 2016; 11(5): 16-22.
15. Syamsudin RM, Rosilawati ML, Cita YP. Antimycobacterial and Antiplasmodial Activities of extract of Propolis from Different Region in Java (Indonesia). *Aust J Basic Appl Sci.* 2011; 5(11): 1030-1034.
16. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* 2005; 22(100): 114-117.
17. Filho AAS, Resende DO, Fukui MJ, Santos FF , Pauletti PM, Cunha WR, et al. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from Baccharisdracunculifolia D.C. (Asteraceae). *Fitoterapia.* 2009; 80: 478-482.
18. Olayemi KI. Therapeutic potentials of Nigerian Insect-propolis against the malaria parasite, *Plasmodium berghei* (Hemeosporida: Plasmodidae). *Amer J Drug Disc Devel.* 2014; 4(4): 241-247.
19. Syamsudin RM, Kusmardi D. Immunodulatory and In vivo Antiplasmodial Activities of Propolis Extracts. *Am J Pharmacol Toxicol.* 2009; 4(3): 75-79.
20. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New Eng J Med.* 2009; 361: 455-457.
21. WHO. Malaria Report 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf
22. Jirattikarn K, Pawornrat N, Atsalek R, Pakorn W, Chanpen C. Preliminary Screening for Various Bioactivities in Honey and Propolis Extracts from Thai Bees. *Eur J Med Plants.* 2012; 2(2): 74-92.
23. Sawaya AC, Abdelnur PV, Eberlin MN, Kumazawa S, Ahn MR, Bang KS, et al. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta.* 2010; 81(1): 100-108.
24. Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 1100-1103.
25. Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 2000; 31: 3-15.
26. Frión-Herrera Y, Díaz-García A, Rodríguez-Sánchez H, Ruiz-Fuentes JL, Fidalgo LM , Setzer WN. Cytotoxic effect of Cuban propolis extracts on normal cells and in-vitro basal toxicity assay to estimate acute oral toxicity. *Am J Ess Oil Nat Prod.* 2014; 2(1): 19-23.
27. Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone- stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. *Prostate.* 1988; 12: 99-110.
28. Jahromi MZ, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp

- fibroblasts. *J Dent Res, Dent Clin, Dent Prospects.* 2014; 8(3): 130.
29. Wijayant MA, Herdiana E, Mardihusodo DSY. Efek bee propolis terhadap infeksi Plasmodium berghei pada mencit Swiss. *ISJD.* 2003; 35(2): 81-89.
30. Khaomek P, Ichino C, Ishiyama A, Sekiguchi H, Namatame M, Ruangrungsi N, et al. In vitro antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *J Nat Med.* 2008; 62(2): 217-220.
31. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Yu, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. *J Ethnopharm.* 1999; 64: 235-240.
32. Monzote L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M, Márquez Hernandez I, Fraga J, Pérez K, et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(8): 978-984.
33. Ruddock PS, Charland M, Ramirez S, López A, Neil Towers GH, Arnason JT, et al. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis.* 2011; 38(2): 82-88.
34. Popova M, Chinou IB, Marekov LK, Bankova SV. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry.* 2009; 70(10): 1262-1271.

Assessment of the cytotoxicity and in vivo anti-Plasmodial activity of ethanol and dichloromethane extracts of four different Iraninan propolis

Afrouzan H^{1,2}, Abouie Mehrizi A³, Shokrgozar S⁴, Tahghighi A³, Es-haghi A⁵, Dinparast Dgadid N⁶, Zakeri S^{6*}

1. PhD Student, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2. Honey bee Department, Animal Sciences Research Institute, Karaj, Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3. Assistant professor, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

4. Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran.

5. Assistant professor, Department of Physics and Chemistry, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

6. Professor, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, zakeris@yahoo.com

Received: 10 April 2017 Accepted: 2 May 2017

Abstract

Background: The emergence of antimalarial drug resistance is one of the great problems of malaria control and elimination of worldwide. In order to overcome anti-malarial drug resistance, cytotoxicity and *in vivo* anti-*Plasmodiumal* activity of four different Iranian propolis were investigated.

Materials and Methods: Four Iranian propolis samples were collected from four different regions of Iran and extracted by %70 ethanol and dichloromethane. The cytotoxicity of ethanolic and dichloromethane extract of propolis, using L969 fibroblast cell lines, were evaluated by MTT assay. The *in vitro* anti-*Plasmodial* activities of the propolis samples on BALB/c mice were assayed.

Results: The cytotoxicity results showed that ethanol and dichloromethane extracts of four Iranian propolis samples at doses of 25, 50, 100 and 200 µg/ml were non-toxic ($P < 0.05$). The highest percentage of growth inhibition against *Plasmodium berghei* with %71 and %65 was for ethanol and dichloromethane extract of Morad Byge propolis, respectively.

Conclusion: Considering the drug resistance of *P. falciparum* to conventional medicine and its dangers, and the emergence of development cheap and safe anti-malaria drugs to control and eliminate programs. Further investigation on Iranian propolis as safe and anti-malarial drug is recommended.

Keywords: Iran, Propolis, Cytotoxicity, Anti-plasmodium.

***Citation:** Afrouzan H, Abouei mehrizi A, Shokrgozar S, Tahghighi A, Es-haghi A, Dinparast Dgadid N, Zakeri S. Assessment of the cytotoxicity and in vivo anti-*Plasmodiumal* activity of ethanol and dichloromethane extracts of four different Iraninan propolis. Yafte. 2017; 18(4): 115-125.