بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی بر رشد و القای آپوپتوز در پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا

امیر کیهانی[1]، ایرج شریفی[2]، بهروز عزت پور[3]، فاطمه ساکی فر[4]، حسین محمودوند[5*]

۱- مربی، مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲- استاد، مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳-مربی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۴- دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۵- دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

یافته / دوره ۲۶ / شماره ۴ / زمستان ۱۴۰۳ / مسلسل ۱۰۲

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۷/۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۸/۸

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی (**Nectaroscordeum koelzii**) بر رشد و القای آپوپتوز در پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: آزمون مهار رشد جهت ارزیابی اثرات عصاره بر روی رده های سلولی ماکروفاژ انسانی (**THP-1**) و پروماستیگوت های سویه استاندارد لیشمانیا تروپیکا (**MHOM/IR/2002/Mash2**) با استفاده از روش **MTT** (**3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide**) انجام گردید. ارزیابی فعالیت آنزیم شبه کاسپاز-۳ در پروماستیگوت با استفاده از کیت های سنجش فعالیت رنگ سنجی آنزیم کاسپاز-۳، براساس دستورالعمل های سازنده انجام شد.

یافته‌ها: عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی به طور معنی داری ($P<0/001$) میزان زنده ماندن پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا را با نیمه حداکثر غلظت بازدارنده (**IC۵۰**) ۸۸/۷ میکروگرم بر میلی لیتر را کاهش داد. یافته ها نشان داد که عصاره همچنین به طور معنی داری ($P <0/01$) فعال سازی آنزیم کاسپاز ۳ را افزایش داد. مقادیر نیمه حداکثر غلظت سمی (**CC۵۰**) عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی و گلوکانتیم بر سلولهای ماکروفاژ **THP-1** به ترتیب ۴۹۶/۹ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۲۱۵/۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثرات بالقوه ضد لیشمانیایی عصاره اتانولی گیاز پیاز تابستانه لرستانی بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا است، در حالی که القاء آپوپتوز می تواند یکی از مهمترین مکانیسم های سلولی اثرات ضد انگلی این عصاره باشد. نتایج همچنین نشان دهنده سمیت سلولی پایین این عصاره بر روی سلول های نرمال انسان بود. با این حال مطالعات بیشتر برای بررسی مکانیسم های سلولی دقیق تر مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، لیشمانیوز، آپوپتوزیس، درمان، سمیت سلولی.

***آدرس مکاتبه:** خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی.

پست الکترونیک: dmahmodvand@gmail.com

مقدمه

لیشمانیوز از بیماری های مهم انگلی است که در مناطق مختلف گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان از جمله ایران انتشار دارد (۱). سازمان جهانی بهداشت تعداد افراد در معرض خطر را ۳۵۰ میلیون نفر وتعداد افراد آلوده به بیماری را ۱۲ میلیون نفر برآورد کرده است (۲). لیشمانیوز جلدی شایعترین نوع این بیماری است که سالانه ۱/۵ میلیون نفر در سرتاسر جهان را آلوده می سازد. بیش از ۹۰ درصد موارد این بیماری از کشورهایی مانند عراق، افغانستان، پاکستان، عربستان سعودی و ایران گزارش می شود (۳). در ایران عوامل انگلی اصلی ایجاد کننده لیشمانیوز پوستی لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) و لیشمانیا تروپیکا (*Leishmania tropica*) هستند (۴). لیشمانیوز احشایی شدیدترین و خطرناکترین فرم این بیماری است که سالانه ۵۰۰ هزار نفر در سرتاسر دنیا به آن مبتلا می شوند. لیشمانیوز احشایی در ایران و در برخی استان ها به صورت آندمیک بوده و عامل اصلی ایجاد کننده آن لیشمانیا اینفانتوم (*Leishmania infantum*) گزارش گردیده است (۵). در حال حاضر جهت درمان لیشمانیوز از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان نظیر پنتوستام (سدیم استیبوگلوکونات)، گلوکانتیم (مگلومین آنتی مونات)، پنتامیدین و آمفوتریسین B استفاده می شود که ترکیبات آنتی موان از سال ۱۹۴۰ اساس درمان لیشمانیوز را تشکیل داده و از داروهای ردیف اول درمان این بیماری محسوب می شوند (۶). استفاده از این ترکیبات دارای محدودیتهایی از قبیل طولانی بودن دوره درمان, گران بودن داروها, عدم پاسخ درمانی در حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد و داشتن سمیت شدید بر روی قلب, کبد و کلیه ها است (۷). از این رو در حال حاضر تحقیقات وسیعی بر روی روشهای درمانی لیشمانیوز در حال انجام است. با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد عوارض جانبی هستند و از طرفی در دسترس و ارزان هستند، این موضوع ضرورت استفاده از گیاهان دارویی هر منطقه را بدین منظور مورد تاکید قرار داده است (۸).

در سال های اخیر خواص ضد لیشمانیایی برخی گیاهان مختلف از جمله گونه‌های آویشن شیرازی، سیر، گونه‌های پسته، نعناع و سیاه دانه مورد بررسی قرار گرفته است (۸). با این حال، کاربرد بالینی این محصولات گیاهی به دلیل نتایج تحقیقاتی متفاوت و نگرانی‌ها در مورد سمیت بالقوه آنها هنوز تایید نشده است (۸). خانواده Liliaceae یا سیر و پیاز دارای ۸۵۰ گونه گیاهی است که اصلی ترین جنس آنها *Allium* است که بیشتر در نواحی کوهستانی می رویند و بیش از ۸۸ گونه از این خانواده در ایران شناسایی شده است که اغلب آنها در فصل بهار به مرحله گلدهی می رسند (۹). از بین جنس های ذکر شده متعلق به این خانواده *Nectaroscordeum* دارای دو گونه *tripedale* و *koelzii* است. گونه اول با نام فارسی پیاز تابستانه است که در نواحی ایران، عراق، ترکیه و قفقاز می روید (۱۰) و گونه دوم با نام فارسی پیاز تابستانه لرستانی است که پراکنش آن در قسمت های مختلف از استان لرستان گزارش شده است (۱۰). در مطالعات مختلف *N. koelzi* به عنوان یکی از گونه های اصلی در طب سنتی برای بهبود سنگ کلیه و مثانه، درد مفاصل، روماتیسم، ناراحتی های گوارشی و زخم ها استفاده می شود (۱۱). در مطالعه حاضر تاثیر عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی (*N. koelzii*) بر رشد و القای آپوپتوز در پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا در شرایط آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه پیاز تابستانه لرستانی

در این مطالعه پس از جمع آوری بخش های هوایی گیاه در نواحی کوهستانی شهرستان خرم آباد در

اردیبهشت ماه و تایید نام علمی، تهیه نمونه هرباریوم (شماره ۹۳-۲۴۷)، قسمت های جمع آوری شده، خشک و پودر گردیده و در ظروف تیره نگداری شدند.

تهیه عصاره اتانولی گیاه

به منظور تهیه عصاره، ۲۰۰ گرم از گیاه خرد شده به ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول و آب مقطر اضافه شده و به مدت ۷۲ ساعت به آرامی مخلوط گردید تا استخراج به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا تا عصاره اولیه بدست آید. عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء گردیده و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد حلال آنها به مدت یک ساعت به آرامی تبخیر گردیده (Heidolph, Germany) و عصاره تغلیظ شده در این مرحله بدست خواهد آمد (۱۲).

تهیه و آماده سازی انگل و سلول ماکروفاژ

رده های سلولی ماکروفاژ انسانی (THP-1) و پروماستیگوت های سویه استاندارد لیشمانیا تروپیکا (MHOM/IR/2002/Mash2) تهیه شده از مرکز تحقیقات لیشمانیوز دانشگاه علوم پزشکی کرمان در فلاسک ۲۵ میلی لیتری حاوی محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (مرک، آلمان) و آنتی بیوتیک های پنی سیلین(۱۰۰IU/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد برای پروماستیگوت ها و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 برای سلول های ماکروفاژ نگهداری گردید. سپس با استفاده از لام نئوبار تعداد پروماستیگوت ها و سلول های ماکروفاژ در زیر میکروسکوپ شمارش و به تعداد یک میلیون در هر میلی لیتر تنظیم گردید (۱۲).

بررسی اثرات ضد لیشمانیایی بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا

آزمون مهار رشد پروماستیگوت‌ها جهت ارزیابی اثرات عصاره و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت های انگل لیشمانیا تروپیکا با استفاده از روش (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT (سیگما آلدریچ، آلمان) انجام گردید. این روش، یک روش رنگ سنجی است که در طی آن نمک تترازولیوم به یک محصول رنگی فورمازان نامحلول تبدیل می شود. این واکنش احیاء توسط فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل انجام می شود، که بعنوان یک پارامتر رشد و زنده بودن پروماستیگوت در برابر پاسخ دارویی به کار می رود. در این مطالعه پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر (۱۰^۶سلول/ میلی لیتر) از پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا به طور جداگانه به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای، در ادامه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف (۶,۲۵-۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره اتانولی که قبل از استفاده با استفاده از فیلتر های استریلیزاسیون (سیگما آلدریچ- آلمان) استریل شده بودند و داروی کنترل (گلوکانتیم) به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای به صورت تریپلیکیت اضافه گردید. علاوه بر این از شاهد یا بلانک (محیط کشت فاقد پروماستیگوت یا دارو) نیز استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، پلیت ها را از انکوباسیون خارج کرده و سپس محلول رویی خارج گردید. سپس۱۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر همراه ۹۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰(مرک، آلمان) به همه چاهک ها اضافه شد. متعاقبا پلیت ها به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون، کریستال های فورمازان را با افزودن حجمی معادل محیط کشت اولیه یعنی به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ایزوپروپانل اسیدی (اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در ایزوپروپانول خالص) حل کرده و رنگ حاصله در طول موج ۴۹۲ با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (LX800; Biotec, USA) قرائت شد و جذب نوری بدست آمده، برای تعیین میزان غلظت مهاری ۵۰٪

(Inhibitory concentration of %۵۰ یا IC۵۰) که غلظتی از عصاره است که از رشد ۵۰ درصد ارگانیسم جلوگیری می کند، بکار گرفته شد. در این مطالعه میزان IC۵۰ با استفاده از آزمون Probit در نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ محاسبه گردید (۱۳).

بررسی فعالیت شبه کاسپاز-۳ در پروماستیگوت

ارزیابی فعالیت آنزیم شبه کاسپاز-۳ در پروماستیگوت با استفاده از کیت های سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ (سیگما آلدریچ، آلمان)، براساس دستورالعمل های سازنده انجام شد. به طور خلاصه، پروماستیگوت ها در غلظت 10^6 سلول در میلی لیتر با عصاره در غلظت های IC۵۰ ۱/۳ و IC۵۰ ۱/۲، IC۵۰ به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از سانتریفیوژ کردن ترکیب در ۶۰۰ دور در دقیقه و ۴ درجه سانتیگراد، رسوب سلولی حاصل لیز شده و به مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفیوژ مجدد با دور ۱۵۰۰ قرار گرفت. پس از این، ۵ میکرولیتر از مایع رویی با ۸۵ میکرولیتر بافر و ۱۰ میکرولیتر محلول کاسپاز-۳ ترکیب شده و مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. چگالی نوری محلول در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (LX800; Biotec, USA) اندازه گیری شد و در نهایت درصد فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ برای همه نمونه ها محاسبه گردید (۱۴).

اثرات سیتوتوکسیک عصاره بر سلولهای ماکروفاژ THP-1

در این آزمایش، ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های ماکروفاژ با غلظت 1×10^6 سلول در هر میلی لیتر به چاهک‌های مجزای یک پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد و سپس غلظت‌های متفاوتی از عصاره به هر چاهک حاوی سلول اضافه شد. سپس پلیت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از آن، مشابه با روش پروماستیگوت، جذب نوری هر چاهک با استفاده از روش MTT اندازه گیری شد. علاوه بر این، برای ارزیابی سمیت سلولی و اثربخشی عصاره، شاخص سمیت سلولی ۵۰٪ (Cytotoxic concentration %۵۰) محاسبه گردید (۱۵).

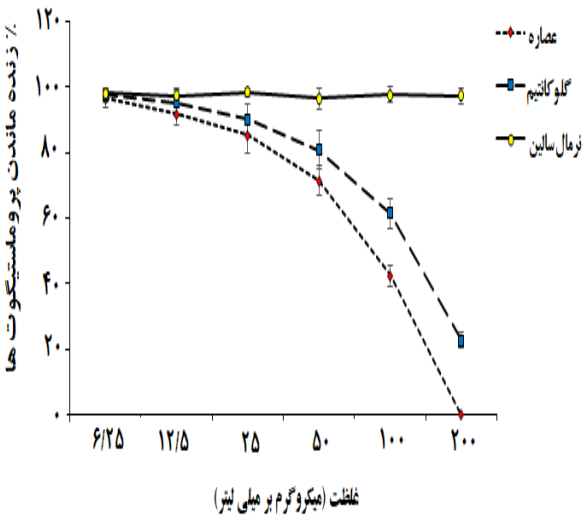
تجزیه و تحلیل داده ها

همه آزمایشات به صورت سه بار تکرار (Triplicate) انجام گردید. بعد از جمع آوری داده ها، در بخش توصیفی از شاخص های مرکزی و پراکندگی استفاده شد. جهت مقایسه اثرات ضد لیشمانیایی عصاره در غلظت های مختلف، از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تعقیب توکی استفاده شد. هم چنین جهت تعیین اثرات ضد انگلی غلظت های مختلف عصاره در مقایسه با گروه کنترل، از آزمون آنالیز واریانس و تست تعقیبی دنت استفاده شد. کلیه آزمون های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد و $P<0/05$ به عنوان سطح معنی داری مورد نظر قرار گرفت.

یافته‌ها

اثرات ضد لیشمانیایی بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا

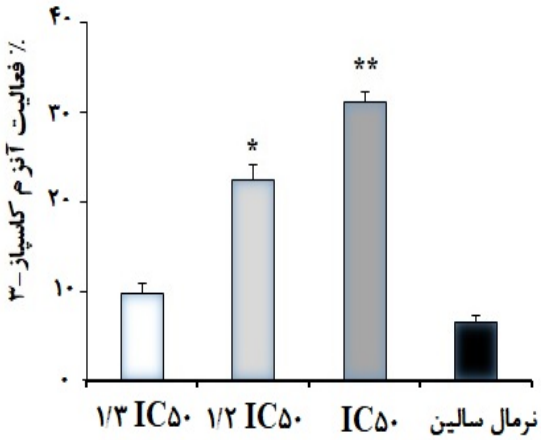
با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون MTT، عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی به طور معنی داری ($P<0/001$) میزان زنده ماندن پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا را در مقایسه با گروه کنترل (نرمال سالین) کاهش داد (شکل ۱). این کاهش در میزان زنده ماندن به صورت وابسته به دوز بود که با افزایش غلظت میزان زنده ماندن به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. علاوه بر این، مقادیر IC۵۰ برای عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی و گلوکانتیم به ترتیب ۸۸/۷ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۲۹/۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید (شکل۱). آزمون های آماری همچنین نشان داد که عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی اثر ضد لیشمانیایی بهتری نسبت به گلوکانتیم از خود نشان داد ($P<0/01$).



شکل۱. اثر ضد لیشمانیایی عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی (Nectaroscordeum koelzii) بر رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی.

بررسی فعالیت شبه کاسپاز-۳ در پروماستیگوت

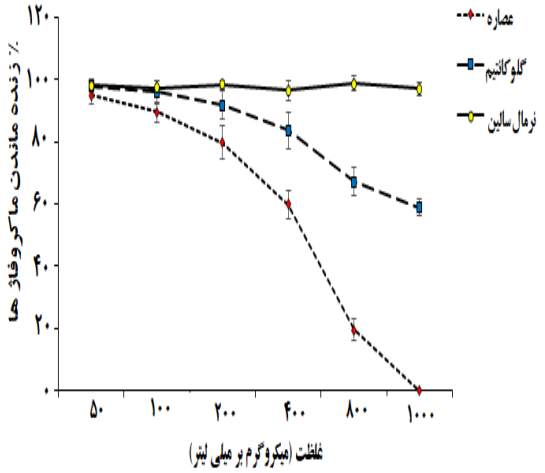
یافته ها نشان داد که عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی در غلظت های معادل IC۵۰ ۱/۲ و IC۵۰ به طور معنی داری ($P < ۰/۰۱$) فعال سازی کاسپاز ۳ را به ترتیب ۲۲/۴٪ و ۳۱/۱٪ با استفاده از کیت های سنجش فعالیت رنگ سنجی آنزیم کاسپاز-۳ افزایش داد (شکل ۲).



شکل۲. بررسی فعالیت شبه کاسپاز-۳ در پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا پس از مواجهه با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی (Nectaroscordeum koelzii).
***P<۰/۰۵ و **P<۰/۰۱ اختلاف معنی دار در مقایسه با کنترل.**
Inhibitory concentration of 50% = IC۵۰

اثرات سیتوتوکسیک عصاره بر سلولهای ماکروفاژ THP-1

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون MTT، عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی به صورت وابسته به دوز میزان زنده ماندن سلولهای ماکروفاژ THP-1 را کاهش داد ($P<۰/۰۰۱$). مقادیر CC۵۰ عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی و گلوکانتیم به ترتیب ۴۹۶/۹ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۲۱۵/۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<۰/۰۰۱$) (شکل ۳)



شکل۳. سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی (Nectaroscordeum koelzii) بر سلولهای ماکروفاژ THP-1 در شرایط آزمایشگاهی.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال های اخیر، تمرکز قابل توجهی در میان محققان بر روی استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری های مختلف صورت گرفته است (۵). در دسترس بودن گسترده، هزینه کم، حداقل عوارض جانبی، اثر بخشی بالا و اثرات ضد میکروبی از مهمترین دلایل استفاده از گیاهان دارویی هستند (۵). گیاهان از خانواده Liliaceae دارای خواص درمانی متنوعی از جمله تقویت سیستم ایمنی، تسکین درد کلیه و مثانه، پیشگیری از

دیابت و نشان دادن اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی هستند (۱۰). با توجه به ویژگی های دارویی متمایز گیاه پیاز تابستانه در درمان بیماری ها و تقویت سیستم ایمنی، این مطالعه اولین مطالعه ای است که به بررسی تاثیر عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی بر رشد و القای آپوپتوز در پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا در شرایط آزمایشگاهی می پردازد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی به طور معنی داری میزان زنده ماندن پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد، به طوری که این عصاره اثر ضد لیشمانیایی بهتری نسبت به گلوکانتیم از خود نشان داد. مطالعات اندکی در مورد اثرات ضد میکروبی به ویژه ضد انگلی گیاهان جنس *Nectaroscordum* وجود دارد. به عنوان مثال، Galehdar و همکاران (۱۱) نشان دادند که عصاره متانولی *N. koelzi*، با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر، پروتواسکولس های اکینوکوکوس گرانولوزوس را به طور کامل و بعد از ۱۰ و ۲۰ دقیقه از بین می برد. محمودوند و همکاران (۱۶) نشان دادند که عصاره متانولی دیگر گونه این جنس یعنی *N. tripedale* در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر همه پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس را پس از به ترتیب ۵ و ۱۰ دقیقه از بین می برد. اخیرا در مطالعه انجام شده بوسیله Alizadegan و همکاران (۱۷) نتایج نشان داد که عصاره متانولی گیاه پیاز تابستانه دارای اثر ضد انگلی قابل توجهی با میزان IC۵۰ به مقدار ۱۷/۴ میکروگرم بر میلی لیتر در مقابل آماستیگوت های لیشمانیا ماژور بود. این تفاوت در نتایج می تواند به علت وجود برخی فاکتورها مانند، نوع عصاره، محل جمع آوری گیاه، نوع گونه انگل، نوع مرحله تست شده انگل، و غلظت های مورد استفاده باشد. در مطالعات قبلی در ارتباط با بررسی فیتوشیمیایی عصاره گیاه پیاز تابستانه لرستانی، وجود ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، تانن ها و اسیدهای چرب را نشان می دهد (۱۰،۱۱). در مورد مکانیسم های ضد میکروبی ترپنوئیدها، مطالعات نشان می دهد که این ترکیبات اثرات ضد میکروبی خود را با تخریب غشای سلولی، وارد شدن به درون سلول و اثر بر اندامک های کلیدی درون سلولی، اختلال در سنتز DNA، و تداخل با سنتز اسیدهای چرب نشان می دهند (۱۸،۱۹). تحقیقات نشان همچنین نشان می دهد که آپوپتوز به عنوان یک مکانیسم اساسی برای سلول های میزبان برای تنظیم و ریشه کن کردن پاتوژن های میکروبی عمل می کند (۲۰). یافته ها مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی در غلظت های معادل IC۵۰ ۱/۲ و IC۵۰ به طور معنی داری باعث فعال سازی آنزیم کاسپاز ۳ شد، که نشان می دهد این عصاره اثرات ضد لیشمانیایی خود را با القا آپوپتوز نشان می دهد. در ارتباط با اثرات سمیت سلولی این عصاره، نتایج ما نشان داد که عصاره اتانولی گیاه پیاز تابستانه لرستانی به صورت وابسته به دوز میزان زنده ماندن سلولهای ماکروفاژ THP-1 را با CC۵۰ عصاره ۴۹۶/۹ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش می دهد. به موازات این نتایج مطالعه حاضر Alizadegan و همکاران (۱۷) نشان داد که میزان CC۵۰ عصاره متانولی گیاه تابستانه بر روی سلول های ماکروفاژ موشی (J۷۷۴-A) برابر با ۵۹۶/۳ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید، که این تفاوت در سمیت سلولی میتواند بدلیل نوع عصاره، محل جمع آوری گیاه، و نوع سلول انتخاب شده باشد. از مهمترین محدودیت های این مطالعه می توان به نبود آنالیز فیتوشیمیایی گیاه و همچنین عدم بررسی مولکولی بیان ژن های مربوط به آپوپتوز و سایر مکانیسم های سلولی اشاره کرد.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثرات بالقوه ضد لیشمانیایی عصاره اتانولی گیاز پیاز تابستانه لرستانی بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا است، در حالی

که القاء آپوپتوز می تواند یکی از مهمترین مکانیسم های سلولی اثرات ضد انگلی این عصاره باشد. نتایج همچنین نشان دهنده سمیت سلولی پایین این عصاره بر روی سلول های نرمال انسان بود. با این حال مطالعات بیشتر برای بررسی مکانیسم های سلولی دقیق تر مورد نیاز است. توصیه می شود در مطالعات آتی مکانیسم های دقیق سلولی این عصاره به ویژه در بیان ژن ها و پروتئین های آپوپتوز مورد بررسی قرار گیرد که در صورت اثر بخشی و به حداقل رساندن اثرات جانبی آن بتوان از این عصاره در فاز بالینی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از افرادی که به هر نحوی در جمع آوری داده ها مشارکت داشتند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچگونه تعارض منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

حمایت مالی

این طرح پژوهشی با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با کد ۹۳/۲۴۷ به ثبت رسیده است

مشارکت نویسندگان

امیر کیهانی، حسین محمودوند و فاطمه ساکی فر، طراحی علمی، گردآوری و تجزیه تحلیل داده‌ها، بهروز عزت پور و حسین محمودوند انجام آزمایشات، حسین محمودوند و ایرج شریفی نگارش مقاله، اصلاح و تایید نهایی مقاله را انجام داده اند

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این پژوهش در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی کرمان با کد ۹۳/۲۴۷ به تصویب رسید.

References

1. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. F1000Research. 2017;6.
2. Alemayehu B, Alemayehu M. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. Health Science Journal. 2017;11(4):1.
3. Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, Suarez JA. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. Current tropical medicine reports. 2021 Jun;8:121-32.
4. Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RC, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. Applied Microbiology and Biotechnology. 2020 Nov;104:8965-77.
5. Copeland NK, Aronson NE. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. Current Opinion in Infectious Diseases. 2015 Oct 1;28(5):426-37.
6. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta tropica. 2011 May 1;118(2):87-96.
7. Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. Parasitology research. 2008 Jun;103(1):1-0.
8. Tajbakhsh E, Khamesipour A, Hosseini SR, Kosari N, Shantiae S, Khamesipour F. The effects of medicinal herbs and marine natural products on wound healing of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. Microbial Pathogenesis. 2021;161:105235.
9. Kendler BS. Garlic (Allium sativum) and onion (Allium cepa): a review of their relationship to cardiovascular disease. Preventive medicine. 1987 Sep 1;16(5):670-85.
10. Zarabi S, Ahmadi S, Rostami R. Anticancer activity evaluation of methanolic extract of Allium Jesdianum and Nectaroscordeum Coelzi against HeLa and K562 cell lines. Yafte. 2017;19(1).
11. Galehdar N, Niazi M, Jahanbakhsh S, Mahmoudvand H, Rouientan A. Evaluation of protoscolicidal effects of Nectaroscordum koelzi methanolic extract against hydatid cyst protoscoleces. Entomology and Applied Science Letters. 2018;5(1-2018):76-1.
12. Mahmoudvand H, Sepahvand P, Jahanbakhsh S, Azadpour M. Evaluation of the antileishmanial and cytotoxic effects of various extracts of garlic (Allium sativum) on Leishmania tropica. Journal of Parasitic Diseases. 2016 Jun;40:423-6.
13. Ezatpour B, Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Azadpour M,

Ezzatkhah F. In vitro and in vivo antileishmanial effects of Pistacia khinjuk against Leishmania tropica and Leishmania major. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015;2015(1):149707.

14. Ezzatkhah F, Khalaf AK, Mahmoudvand H. Copper nanoparticles: Biosynthesis, characterization, and protoscolicidal effects alone and combined with albendazole against hydatid cyst protoscoleces. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021 Apr 1;136:111257.
15. Mahmoudvand H, Dezaki ES, Ezatpour B, Sharifi I, Kheirandish F, Rashidipour M. In vitro and in vivo antileishmanial activities of Pistacia vera essential oil. Planta medica. 2016 Mar;82(04):279-84.
16. Mahmoudvand H, Ezatpour B, Rashidipour M, Mirbadie SR, Mahmoudvand H (2016b) Evaluation of the scolicidal efects of Nectaroscordum tripedale extract and its acute toxicity in mice model. Pak J Pharm Sci 29(6):2125–2128.
17. Alizadegan F, Aghaei M, Kumar SJ, Saadatmand M, Kumar SA. In vitro and in vivo antileishmanial effects of Nectaroscordum koelzi extract against Leishmania major. Journal of Parasitic Diseases. 2023 Sep;47(3):683-8.
18. Ezatpour B, Azami M, Motamedi M, Rashidipour M, Mahmoudvand H, Alirezaei M et al (2016) Chemical composition, in vitro antibacterial and cytotoxicity efect of Nectaroscordum tripedale extract. Herb Med J 5:29–36.
19. Ismail A, Lamia H, Mohsen H, Samia S, Bassem J (2013) Chemical composition and antifungal activity of three Anacardiaceae species grown in Tunisia. Sci Int 1(5):148–154.
20. Basmaciyan L, Azas N, Casanova M. Different apoptosis pathways in Leishmania parasites. Cell Death Discovery. 2018 Aug 20;4(1):90.

Effect of *Nectaroscordeum koelzii* ethanolic extract on the growth and induction of apoptosis in *Leishmania tropica* promastigotes

Keyhani A[1], Sharifi I[2], Ezatpour B[3], Sakifar F[4], Mahmoudvand H[5*]

1. Instructor, Leishmaniasis Research Center, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Professor, Leishmaniasis Research Center, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Instructor, Razi Herbal Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

4. MD Student, Student Research Committee, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

5. Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, dmahmodvand@gmail.com

Received: *2024/9/28* Accepted: *2024/10/29*

Abstract

Background: This study aims to investigate the *in vitro* effects of ethanolic extract of *Nectaroscordeum koelzii* on the growth and induction of apoptosis in promastigotes of *Leishmania tropica*.

Materials and Methods: A growth inhibition test was conducted to evaluate the effects of the extracts and a control drug on human macrophage cell lines (THP-1) and promastigotes of the standard strain of *Leishmania tropica* (MHOM/IR/2002/Mash2), which was obtained from the Leishmaniasis Research Center of Kerman University of Medical Sciences. The MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used for this evaluation. Additionally, the activity of the caspase-3-like enzyme in promastigotes was assessed using colorimetric Caspase-3 activity assay kits (Sigma-Aldrich, Germany), following the manufacturer's instructions.

Results: The ethanolic extract of *N. koelzii* significantly reduced the viability of *L. tropica* promastigotes ($P < 0.001$), with an inhibitory concentration 50 (IC50) value of 88.7 µg/ml. The findings also indicated that the extract significantly increased the activation of the caspase-3 enzyme ($P < 0.01$). the cytotoxic concentration 50 (CC50) values for the ethanolic extract of *N. koelzii* and glucantime on THP-1 macrophage cells were 496.9 µg/ml and 1215.2 µg/ml, respectively.

Conclusion: The results of the present study indicate the potential anti-leishmanial effects of the ethanolic extract of *N. koelzii* on the promastigotes of *Leishmania tropica*. Induction of apoptosis may also be one of the most significant cellular mechanisms underlying the anti-parasitic effects of

this extract. Additionally, the findings demonstrate that this extract exhibits low cytotoxicity towards normal human cells. However, further studies are needed to investigate the exact cellular mechanisms.

Keywords: Medicinal Plants, Leishmaniasis, Apoptosis, Treatment, Cytotoxicit.

Citation: Keyhani A, Sharifi I, Ezatpour B, Sakifar F, Mahmoudvand H. Effect of Nectaroscordeum koelzii ethanolic extract on the growth and induction of apoptosis in Leishmania tropica promastigotes. 2024; 26(4):26-36