جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اثرعصاره گیاه میموزاتنوئی فلورا بر تکثیر انگل لیشمانیا در محیط کشت

دکتر سعداله شمس‌الدینی[۱]، سعید رجبعلیان [۲]، دکتر محبوبه میرزایی[۳]، دکتر مریم برفه‌ای[۳]

۱ـ استادیار، گروه پوست، ۲ـ کارشناس ارشد رشدسلولی، ۳ـ پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

زمینه و هدف : لیشمانیوز بیماری انگلی مشترک بین انسان و حیوان با تنوع بالینی گسترده است، که به وسیله انگل تک یاخته متعلق به جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. درمان در لیشمانیوزیس انسانی هنوز بر پایه استفاده از ترکیب‌ها آنتی‌موان ۵ ظرفیتی و پرعارضه است و مقاومت نسبت به این ترکیب‌ها هم مسأله و مشکلی است که ضرورت تلاش برای دستیابی به داروی جدیدی را بیش‌تر می‌کند. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان اثر ضد لیشمانیایی عصاره گیاهی درخت پوست یا تنویی فلورا میموزا بر انواع خارج سلولی (پروماستیگوت) لیشمانیا ترویپکا صورت پذیرفت.

روش اجرا: بررسی اثر این عصاره به دو روش شمارش انگل زنده و نیز متیل تیازول تترازولیوم در محیط کشت آزمایشگاه در مجاورت با غلظت‌های صفر، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره گیاه میموزا صورت گرفت.

یافته‌ها: عصاره این گیاه در غلظت‌های متفاوت بر سرعت تکثیر انگل لیشمانیا آثار متضادی دارد. بدین ترتیب که غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آن سرعت تکثیر انگل را کم می‌کند، در حالی که غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث افزایش این سرعت می‌شود.

نتیجه‌گیری: در تکثیر انگل لیشمانیادر عصاره گیاه میموزا احتمالاً عوامل مهاری یا تسریعی وجود دارند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا، میموزا تنوئی فلورا، درمان، محیط کشت

وصول مقاله: ۸۴/۵/۵ پذیرش: ۸۴/۱۰/۶ *فصلنامه بیماری‌های پوست۱۳۸۵؛دوره ۹ (۲) : ۱۷۳ -۱۷۸*

مقدمه

عامل بیماری لیشمانیازیس تک یاخته‌ای از راسته کینتوپلاست‌داران است که برحسب محیط زندگی خود به دو شکل دیده می‌شود: پروماستیگوت (promastigote) دوکی شکل، تاژکدار، با تحرک زیاد که در محیط کشت، روده و خرطوم پشه خاکی دیده می‌شود و زندگی خارج سلولی را طی می‌کند(۳-۱). آماستیگوت (amastigote) انگل تخم‌مرغی یا گردویی شکل شده و کوچک‌تر از نوع پروماستیگوت و بدون تاژک است که زندگی داخل سلولی اجباری را در سلول‌های رتیکواندوتلیال پوست و احشا حیوان‌های مهره‌دار سپری می‌کند(۵ و۴). انگل در بدن سگ و جوندگان به شکل مخزن باقی می‌ماند و انتقال از حیوان به انسان و گاهی از انسان به انسان وسیله گونه‌هایی از پشه خاکی به نام‌های فلبوتوموس (Phlebotomus) در مناطق دنیای قدیم و لوتزومیا (Lutzomyia) در کشورهای دنیای جدید صورت می‌گیرد(۹-۶).

درمان لیشمانیازیس در انسان هنوز بر پایه مصرف ترکیب‌های آنتی‌موان ۵ ظرفیتی است. اما علاوه بر عوارض کاربرد این ترکیب‌ها، مقاومت انگل نسبت به آن‌ها هم یک

مؤلف مسوول: دکتر سعداله شمس‌الدینی- کرمان، خیابان شریعتی، ساختمان پزشکان زمرد

پست الکترونیک: shamsadini@yahoo.com

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مشکل رو به تزاید است. البته باید اضافه کرد که به دنبال همراه شدن (Coinfection) انگل لیشمانیا با ویروس HIV در بدن، پدیده مقاومت انگل به دارو افزایش می‌یابد(۱). براین اساس پژوهشگران همواره درصدد کشف داروهای ضد لیشمانیایی جدید هستند. در این زمینه تاکنون مطالعه‌های گسترده‌ای روی عصاره گیاهان و ترکیب‌های مختلف صورت گرفته که از جمله، عصاره اتیل استات از گیاه پودوکالیکس (Podocalyx loranthoides) است که علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا مکزیکانا اثر نسبی دارد(۱۰). روغن لینالوول (Linalool) که از برگ‌های Croton cajucara گرفته می‌شود علیه لیشمانیا آمازونیس(۱۱) و نیز عصاره گیاه Urechites (apocynaceae) و Muell arg andrieuxii که گیاهی در شبه جزیره Yucatan است در درمان لیشمانیوز پوستی استفاده گسترده‌ای دارد(۱۳ و ۱۲و ۶). دیگر ترکیب‌های به کار گرفته شده شامل : Otaba parviflora ، Marila laxiflora ، Guara polymera ، panamense ، Ampnosperma ، Hygrophila guidonia ، Jacaranda caucana است(۱۶-۱۴و۵). عصاره درخت پوست (Mimosa tenuiflora) ترکیب‌های متعددی دارد و در درمان زخم‌های مزمن (chronic wound care) استفاده می‌شود(۱۷). در این مطالعه اثر این عصاره روی تکثیر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیای اخذ شده از بیمار درمحیط کشت آزمایشگاهی با دو روش شمارش انگل زنده و روش رنگ سنجی (MTT assay) Methyl thiazole tetrazolium مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش اجرا

محیط کشت Dolbeco's modified eagle's medium (DMEM/F12) بدون فنل قرمز (phenol red) که دارای ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES از کمپانی سیگما، سرم جنین گاوی Fetus bovine serum (FBS) از کمپانی Seru med آلمان و کیت سنجش تکثیر انگل (MTT-Cell Proliferation Kit) از کمپانی Boehringer Mannheim آلمان تهیه شد. فلاسک کشت انگل از پلیت‌های ۴۸ و ۹۶ خانه‌ای کمپانی NUNC دانمارک بوده است. گیاه میموزاتنوئی فلورا ساخت کمپانی Lutsia کشور فرانسه از داروخانه تهیه شد. سوسپانسیونی از عصاره فوق معادل ۲۰۰ میلی گرم د رهر میلی‌لیتر متانول تهیه و به حجم‌های کوچک تقسیم و تا زمان مصرف در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

انگل از ضایعه جلدی فرد مبتلا به لیشمانیازیس، که در کرمان، عمدتاً ناشی از L.tropica می‌باشد، جدا گردید. این انگل در محیط کشت DMEN/F12 حاوی FBS10% که دارای ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین در میلی‌لیتر است (محیط کشت کامل) کشت شد. در تمامی مراحل تحقیق، رشد و تکثیر سلول‌های پروماستیگوت بدون تغییر ادامه یافت.

روش MTT-assay : سوسپانسیون معادل ۲۰۰ هزار انگل پروماستیگوت در میلی‌لیتر در محیط کشت DMEM/F12 بدون فنل قرمز حاوی ۱۰٪ جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک تهیه شد. پنجاه میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به حفرات پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل افزوده شد. سپس رقت‌های ۲۰۰۰،۱۰۰۰،۲۰۰،۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره با روش رقیق‌سازی سریالی در محیط کشت بالا تهیه و پنجاه میکرولیتر از هر عصاره رقیق‌شده به شش چاهک پلیت حاوی انگل افزوده شد. بدین ترتیب حجم نهایی محیط کشت در ۰/۰۱ میلی‌لیتر تنظیم شد. کشت‌های کنترل شامل: کشت انگل بدون افزودن عصاره گیاه میموزا و کشت انگل در محیط حاوی ۰/۵٪ متانول در نظر گرفته شد. از محیط کشت حاوی عصاره میموزا به

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

عنوان محیط بلانک استفاده شد. پلیت به مدت ۷۲ ساعت در شرایط ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس آزمون سنجش رشد و تکثیر سلول‌های پروماستیگوت با استفاده از کیت MTT-assay صورت گرفت. به طور خلاصه می‌توان گفت، ابتدا کروموژن MTT با ترکیب تسریع‌کننده انتقال الکترون phenazine methosulfate (PMS) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت مخلوط و سپس ۵۰ میکرولیتر از مخلوط به هر چاهک پلیت افزوده شد. پس از سپری شدن ۲ ساعت، شدت رنگ به وسیله دستگاه ثبت الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر و رفرانس ۶۳۰ نانومتر ثبت و تمام مراحل آزمون ۵ بارتکرار شد.

روش شمارش انگل زنده: سوسپانسیون سلول‌های پروماستیگوت شامل ۴۰۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر محیط کشت کامل تهیه و دویست و پنجاه میکرولیتر از سوسپانسیون به چاهک‌های پلیت ۴۸ خانه‌ای افزوده شد. سپس رقت‌های ۲۰۰، ۲۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره میموزا تهیه و دویست و پنجاه میکرولیتر هر رقت به شش چاهک پلیت حاوی انگل افزوده شد. بدین ترتیب حجم نهایی محیط کشت در ۰/۵ میلی‌لیتر در رقت‌های نهایی عصاره میموزا روی ۱۰، ۲۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنظیم شد. پلیت در شرایط استاندارد ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و هر ۲۴ ساعت به وسیله رنگ تریپان بلو (tripan blue) شمارش انگل زنده یک مجموعه دوتایی از چاهک‌ها در هر رقت دارو با لام هموسیتومتر صورت گرفت.

تمام مراحل آزمون پنج بار تکرار شد و معدل ۵ بار ملاک تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

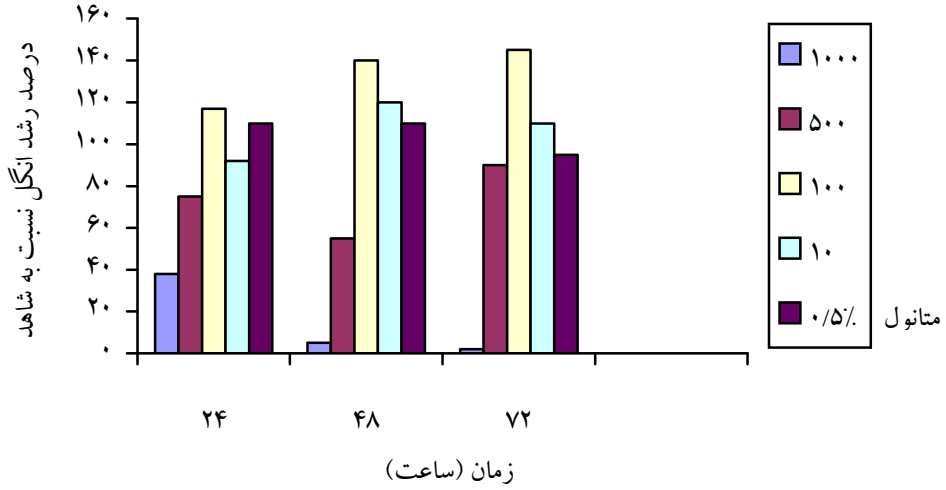
درصد رشد انگل د رمجاورت غلظت‌های مختلف عصاره گیاه میموزا تنویی فلورا و متانول ۰/۵ درصد(به عنوان شاهد) ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. میزان کاهش رشد انگل در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود(P<۰/۰۰۱) ولی میزان کاهش در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد فاقد معنی بود. افزایش رشد انگل در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد نیز معنی‌دار نبود.

۴۸ ساعت بعد از کشت، میزان کاهش رشد انگل در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود(P<۰/۰۰۱). در همین مدت مقدار انگل د رغلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد افزایش نشان دادکه این افزایش در هر دو گروه دارای معنی بود(P<۰/۰۵).

۷۲ ساعت بعد از کشت کاهش مشخص و معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) در مقدار انگل در غلظت ۱۰۰ میکروگرم مشاهده شد، در صورتی‌که در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش انگل به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. افزایش مقدار انگل در غلظت ۱۰۰ میکروگرم درمیلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد نیز معنی‌دار بود(P<۰/۰۰۱).

درصد رشد انگل با توجه به یافته‌های به دست آمده از ارقام خوانده شده از دستگاه ELISA reader طبق فرمول $\frac{A}{B}\times 100$ محاسبه شد (A برابر میزان جذب کنترل ـ میزان جذب محیط کشت بدون انگل و دارو (بلانک) و B برابر میزان جذب آزمون ـ میزان جذب بلانک). بر این اساس رشد و تکثیر انگل بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با رقت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره نسبت به محیط کشت شاهد ۹۷/۳٪ کاهش شدید نشان داد (P=۰/۰۰۱). در همین شرایط رقت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به محیط کشت شاهد ۶۲٪ کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). در رقت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو نسبت محیط کشت شاهد ۲۰٪ افزایش نشان داد و در رقت ۱۰ میکروگرم در

نمودار شماره ۱ـ میزان تکثیر پروماستیگوت‌های لیشمانیا در مجاورت غلظت‌های ۱۰۰۰ ، ۵۰۰ ، ۱۰۰ ، ۱۰ ، ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میموزا و متانول ۰/۵٪ (به عنوان شاهد)



میلی‌لیتر، رشد انگل، معادل شاهد سنجش شد. نتایج بررسی سمیت حلال با دو روش شمارش انگل‌های زنده و روش MTT رشد و تکثیر انگل بعد از ۷۲ ، ۴۸ ، ۲۴ ساعت در مجاورت با رقت‌های ۰/۵ و ۱۰٪ متانول نسبت به محیط شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

بحث

عصاره گیاه میموزا تنوئی فلورا برای ترمیم زخم‌های پوستی در انسان مانند سوختگی‌های درجه ۲ و ۳ و نیز بعد از بخیه کردن زخم و قبل و بعد از الکترولیز موها و لیزر درمانی به کار می‌رود. مشخص شده است که عصاره فوق در هر سه مرحله ترمیم زخم‌های مزمن، اثر مفید دارد به طوری که این ترکیب می‌تواند فرایند هموستاز را تسهیل و مهاجرت فیبروبلاست‌ها را به موضع تسریع و از ترشح زیادی رشته‌های کلاژن زخم جلوگیری کند و در نهایت با ایجاد غشای پایه یک‌نواخت و ظریف در بستر زخم ترمیم طبیعی زخم را سبب شود(۲۲-۱۸). ترکیب‌های عمده عصاره این گیاه که به طور استاندارد تجزیه شد که شامل سدیم آلجینات ۱/۵٪ ، عصاره comrey به میزان ۲٪ ، دی پانتول در حدود ۲٪ ، هیدروکسی پرولیسیلان ۵٪ ، لوکونات روی ۰/۵٪ است(۲۴و۲۳و۲۰). اثر ضد باکتریایی این عصاره ثابت شده است ولی چون برای سنجش اثرضد انگلی دارو هیچ اقدامی صورت نگرفته بود، پژوهشی به این منظور ضروری می‌نمود. در این تحقیق اثر ضدلیشمانیایی عصاره مزبور با دو روش شمارش انگل زنده و سنجش MTT به صورت in vitro بررسی شد. با هر دو روش ثابت شد این عصاره در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد و تکثیر انگل را متوقف می‌کند. برخلاف انتظار، این مطالعه به روش شمارش انگل زنده نشان داد که دارو در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در

میلی‌لیتر، رشد و تکثیر انگل را به صورت قابل‌ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد. هم چنین نتایج به دست آمده با روش MTT مشخص کرد که دارو در غلظت مشابه رشد و تکثیر انگل را افزایش می‌دهد که این یافته احتمال حضور عامل یا عوامل مهارکننده وتسریع کننده‌ی تکثیر انگل در عصاره گیاه میموزا تنوئی فلورا را مطرح می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد در رقت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فعالیت عوامل مهارکننده بر عوامل تسریع‌کننده تکثیر انگل برتری دارد، در حالی که در رقت‌های کم‌تر، مقدار عوامل مهارکننده در محیط برای ممانعت از تکثیر انگل کافی نیست و رقت عوامل تسریع‌کننده بر رشد انگل فزونی دارد و در نهایت موجب افزایش تکثیر انگل در رقت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره گیاه میموزا تنوئی فلورا می‌شود.

از نتایج قابل بحث این تحقیق، اثربخشی دوگانه عصاره گیاه میموزا بر تکثیر انگل با دو روش شمارش انگل زنده و روش MTT است. این تست با توجه به فعالیت زنجیره تنفسی میتوکندری (سوکسینیل تترازولیوم ردوکتاز) در سلول‌های زنده عمل می‌کند. به این ترتیب که فعالیت میتوکندری سبب احیا نمک تترازولیوم MTT به ترکیب رنگی فورمازان می‌شود. هرچه فعالیت میتوکندری بیش‌تر باشد، احیای MTT با این ترکیب رنگی بیش‌تر می‌شود. در روش شمارش انگل زنده در رقت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بعداز ۷۲ ساعت تعداد انگل تقریباً معادل شاهد سنجش شد در حالی که در روش MTT کاهش قابل توجه فعالیت بیولوژیک انگل نسبت به شاهد مشاهده شد که احتمالاً به علت تأثیر ترکیبی از عصاره گیاه میموزا تنوئی فلورا در این غلظت روی غشای میتوکندری یا آنزیم‌های درگیر در زنجیره تنفسی میتوکندری بوده و در نتیجه تبدیل MTT به ماده رنگی فورمازول کاهش می‌یابد.بنابراین عامل یا عواملی در عصاره گیاه میموزا تنوئی فلورا وجوددارد که روی تکثیر سلول تأثیر ندارد ولی روی فعالیت میتوکندری اثر مهاری دارد. هم چنین این غلظت از دارو سبب تغییرهای مورفولوژیک واضح در انگل می‌شود. به این صورت که انگل‌ها به شکل گرد، کوچک، به هم چسبیده ودارای تحرک بسیار کم‌تر درمی‌آیند. بنابر این سرعت تکثیر انگل لیشمانیا در مجاورت عصاره گیاه میموزا تنوئی فلورا با غلظت‌های متفاوت دارای آثار متضادی است و به کارگیری انجام ترکیب موضعی برای زخم‌های سالک توصیه نمی‌شود. این بررسی‌ها بیش‌تر در پژوهش‌های آینده روی اجزای تشکیل‌دهنده این عصاره به منظور کشف عوامل مهارکننده تکثیر انگل پیشنهاد می‌شود.

References

1-Leandro C, Campino L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemo resistance. Inter Antimicrobial Agent 2003; 22: 325-57.

2-Fekri A. Immunological basis and clinical manifestation of AIDS, leprosy and cutaneous leishmaniasis. 1379; 71-73.

3-Dowlati Y. Treatment of cutaneous leishmaniasis (Old World). Clin Dermatol1996; 14: 513-18.

4-Williams TJ. Factors that affect vessel reactivity and leukocyte emigration. In: Clark RAF, Henson PM, eds. Molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press, 1988: 115-83.

5-Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. Clin Dermatol1996; 14: 425-31.

6-Chan-Bacab MJ. Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andrieuxii. J Ethnopharmacol 2003; 86: 243-47.

7-Najim RA. Zinc sulfate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: an invitro and animal study. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93: 831-33.

8-Sharquie KB, Najim RA, Farrouj IB, et al. Oral zinc sulfate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol 2001; 26: 21-26.

9-Puentes F, Guzman F, Marin V, et al. Leishmania; fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conservedcore domains involved in binding and internalization . Exp Parasitol 1999; 93: 7-22.

10-Suarez Al. Biflavonoids from Podocalyx loranthoides. Fitoterapia 2003; 74: 473-75.

11-De Goes P. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:1895-901.

12-Ferreia IC. Antileishmanial activity of alkaloidal extract from Aspidosperma ramiflorum. Mem Inst Owaldo Cruz, 2004; 99: 325-27.

13-Hobal FM, Burrows CE, Movat HZ. Generation of skin in by plasma kallikrein and plasmin. In Sicuteri F, Black N, Haberland GL, editors. Skin: pharmacodynamic and biological role. New York: Plenum Press; 1976:23-36.

14-Weniger B. Antiprotozoal activities of Colombian plants. J Ethnopharmacol 2001; 78: 193-200.

15-Mc Kay LA, Leigh IM. Epidermal cytokines and their roles in the cutaneous wound healing. Br J Dermatol 1988; 22: 1-12.

16-Norris DA, Clark RAF, Swidart LM, et al. Fibronectin fragments are chemotactic for human peripheral blood monocytes. J Immunol 1988; 129: 1612-18.

17-Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair. A study with anti neutrophil serum. J Clin Invest 1972; 51: 2009-23.

18-Clark RAF. Fibronection matrix deposition and fiboronection receptor expression in healing and normal skin. J Invest Dermatol 1990; 94: 128s-134s.

19-Clark RAF. Cutaneous tissue; basic biologic consideration. J Am Acad Dermatol 1985; 13: 701-25.

20-Clark RAF. Cutaneoud wound repair: Molecular and cellular controls. Progr Dermatol 1988; 22: 1-12.

21-Cromak DT, Porras-Reyes B, Mustose TA. Current concept in wound healing growth factor and macrophage interaction. J Trauma 190; 309: 129s-133s.

22-Dvorak HF, Kaplan AP, Clark RAF. Potential functions of the clotting system in wound repair. In: Clark RAF, Henson PM, editors. Molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press, 1988:57-85.

23-Stecher VJ, Sorkin E. The chemotactic activity of fibrin lysis product. Int Arch Allergy Appl Immunol 1972; 43: 879-86.

24-Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. J Microbiol Method 2003; 55: 813-16.