

بررسی تأثیر عصاره گیاه کاملیا ساینسیس بر پروماستیگوت انگل‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم با روش رنگ سنجی MTT

سودابه الله‌دین^۱، شهرام خادم وطن^۲، محمود هاشمی تبار^۳، البرز اسکندری^۴*

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۸/۳۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از آنها منبع غنی از ترکیبات دارویی را فراهم می‌کنند و از گیاهان بومی برای درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره گیاه چای سبز در مقایسه با داروی کنترل مگلوومین آنتیمونات (گلوکانتیم®) با استفاده از روش رنگ سنجی MTT هست.

مواد و روش‌ها: پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS و آنتی‌بیوتیک هست در دمای ۲۴±۱°C کشت داده شد و تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره چای سبز در مقایسه با گلوکانتیم بر روی پروماستیگوت‌های این دو گونه انگل لیشمانیا، با استفاده از روش رنگ سنجی MTT مورد بررسی قرار گرفت. میزان جذب نوری به وسیله دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و سپس نتایج به صورت IC₅₀ بیان شده است.

نتایج: میزان IC₅₀ عصاره بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، برای لیشمانیا ماژور ۱۹۱۱ g/ml و برای لیشمانیا اینفانتوم ۱۲۱۱ g/ml به دست آمد به طوری که میزان IC₅₀ داروی کنترل گلوکانتیم برابر ۲۱/۸ μg/ml و ۱۰/۱۶ μg/ml به ترتیب برای لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم هست.

بحث و نتیجه‌گیری: اثربخشی این عصاره بر روی این گونه انگل تقریباً معادل گلوکانتیم می‌باشد و بنابراین دارای پتانسیل استفاده از آن به عنوان داروی ضد لیشمانیایی می‌باشد اما ضرورت انجام آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا در مدل‌های حیوانی و In vivo احساس می‌شود.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، لیشمانیا اینفانتوم، کاملیا ساینسیس، روش رنگ سنجی MTT

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دهم، ص ۹۰۰-۸۹۳، دی ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: اهواز - دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور - دانشکده داروسازی - گروه شیمی دارویی، تلفن: ۰۹۱۶-۳۵۴۵۴۰۶

Email: alborz86pharmacist@gmail.com

مقدمه

در ۱۰ کشور افغانستان، الجزیره، عربستان سعودی، ایران، سوریه، بولیوی، برزیل، کلمبیا، نیکاراگوئه و پرو رخ می‌دهد. ۹۰ درصد موارد لیشمانیوز احشایی از کشورهای بنگلادش، برزیل، هند، نپال و سودان گزارش شده است. ۹۰ درصد موارد گزارش شده لیشمانیوز جلدی - مخاطی مربوط به کشورهای بولیوی، برزیل و پرو است (۱).
رویکردهای درمانی به فاکتورهای میزبان و انگل بستگی دارد. داروهای خط اول مورد استفاده در درمان لیشمانیوز، از جمله ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیمون (مثل گلوکانتیم)

لیشمانیوز به طیفی از بیماری‌ها گفته می‌شود که توسط تک‌یاخته‌هایی از راسته کینتوپلاست داران و از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و تظاهرات بالینی این بیماری عفونی به سه فرم جلدی، جلدی - مخاطی و احشایی دیده می‌شود. بررسی‌های اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که ۱۲ میلیون نفر در سراسر جهان با این بیماری درگیرند و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلای به این بیماری هستند و سالیانه ۲ میلیون مورد جدید اضافه می‌شود. بیش از ۹۰ درصد موارد لیشمانیوز جلدی

^۱ کارشناسی ارشد انگل شناسی، گروه پارازیتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

^۲ استادیار انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۳ دانشیار جنین شناسی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

^۴ دانشیار جنین شناسی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (نویسنده مسئول)

مواد و روش‌ها

تهیه و استخراج عصاره گیاه کاملیا ساینسیس:

برگ‌های تازه گیاه چای سبز (*Camellia sinensis*) از شهر شیراز استان فارس تهیه شده است. این برگ‌ها در دمای اتاق خشک شده و به مدت ۴۸ ساعت با روش پرکولاسیون با اتانول در دمای اتاق عصاره‌گیری شده‌اند، سپس مایع رویی با استفاده از صافی‌های ۰/۴۵ میکرونی فیلتر شده سپس اتانول به‌وسیله تبخیر کنند چرخان (Rotary evaporator, 4003, Heidolph) (Schwabach, Germany) در دمای کمتر از ۵۰°C تبخیر شد و عصاره خشک شده آسیاب گردید تا زمان استفاده به‌صورت پودر نگهداری شد. در زمان استفاده این پودر در PBS با 1% DMSO (خریداری شده از شرکت Sigma) حل شد (۱۲) و جهت جلوگیری از آلودگی، این عصاره فیلتر شد و سپس رقت‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۱۹۲ میکروگرم بر میلی لیتر وزنی-حجمی به کمک محیط کشت RPMI تهیه شد.

تهیه داروی کنترل گلوکانتیم:

از داروی مگلو مین آنتی‌مونات با نام تجاری گلوکانتیم (Glucantime®) به‌عنوان کنترل استفاده شده است. این دارو یک آنتی‌موان ۵ ظرفیتی است. این دارو در دمای ۴°C نگه‌داری شده و در زمان انکوباسیون به‌وسیله RPMI-1640 رقیق شده است.

کشت پروماستیگوت‌ها:

سویه‌های استاندارد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا اینفانتوم (MCAN / IR / 96 / LONDON 49) و لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از آزمایشگاه تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شده‌اند. ابتدا پروماستیگوت‌های انگل‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در محیط RPMI-1649 (Sigma) به همراه ۱۰ درصد FCS و ۱۰۰ Iu/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در دمای ۳۷ ± ۱°C کشت داده شدند و پس از رسیدن پروماستیگوت‌ها به فاز لگاریتمی رشد تعداد آن‌ها به کمک لام هموسیتمتر به Cell / ml 1×10^6 تعدیل گردیدند و از آن جهت مطالعات استفاده شد (۱۳).

روش رنگ‌سنجی MTT:

آزمایش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط Mosmann جهت مطالعات ایمونولوژیک به کار برده شد. MTT یک روش کمی اسپکتروفوتومتری غیر رادیواکتیو برای تعیین تکثیر سلولی، حیات سلولی و تعیین سمیت داروها است. این روش، یک روش رنگ‌سنجی است که طی آن نمک

می‌باشند که عوارض جانبی مثل سمیت برای بیماران به همراه دارد و مقاومت انگل به دارو ایجاد شده است. داروهای خط دوم در درمان لیشمانیوز از جمله آمفوتریسین B و داروی جدید میلنفوسین می‌باشند که به علت در دسترس نبودن و هزینه بالایی که بیمار برای تهیه این داروها متحمل می‌شود، مقرون‌به‌صرفه نیستند. بنابراین به کشف یا توسعه داروهای جدید و مناسب برای درمان این بیماری نیاز مبرم می‌باشد به‌نحوی که دارای حداقل عوارض، در دسترس بودن، قابل‌استفاده از راه خوراکی و کم‌هزینه باشند (۲،۳). بر اساس گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO)، تقریباً ۸۰ درصد مردم دنیا برای درمان بیماری‌های خود به استفاده از داروهای سنتی تمایل دارند (۴) این امر انگیزه‌ای شد تا ترکیبات گیاهی هم برای درمان لیشمانیوز کاندید شوند. یکی از این گیاهان، کاملیا ساینسیس (چای سبز) است که خواص فارماکولوژیک و بیولوژیک متعددی به آن نسبت می‌دهند. در مطالعات متعدد به علت خواص آنتی‌اکسیدانی، اثربخشی این گیاه در آلزایمر، پارکینسون و سرطان بیان شده است (۵-۸). اثرات سودمند کاملیا ساینسیس را به دلیل حضور ترکیبات پلی‌فنلیک موجود در آن می‌دانند که از جمله این ترکیبات می‌توان به اپی‌کاتشین گالات (ECG)، اپی‌کاتشین (EC) و اپی‌گالوکاتشین گالات (EGCG) اشاره کرد (۷،۵). در تحقیقات مختلف انجام شده، EGCG به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، عامل ضدسرطان و عامل ضد انگلی معرفی شده است (۹،۱۰).

روش MTT اولین بار در سال ۱۹۸۳ برای مطالعات ایمونولوژیک به کار برده شد. MTT یک روش فتومتریک بسیار ساده و در عین حال بسیار دقیق است. سوبسترای واکنش نمک‌های محلول تترازولیوم است. در این واکنش MTT توسط آنزیم سوکسینات ردوکتاز شکسته شده و به فورمازان تبدیل می‌شود لذا میزان رنگ فورمازان تولیدشده در طی آزمایش با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. نمک فورمازان تشکیل شده در آب غیرمحلول بوده و بایستی در یک حلال مثل دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به حالت محلول در آید (۱۱).

عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از آن‌ها منبع غنی از ترکیبات دارویی را فراهم می‌کنند و در کشورهای آندمیک از گیاهان بومی جهت درمان بسیاری از عفونت‌ها استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، تعیین اثر ضد لیشمانیایی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چای سبز بر پروماستیگوت انگل‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT و مقایسه آن‌ها با داروی کنترل گلوکانتیم می‌باشد.

بررسی تغییرات مورفولوژیک:

برای مشاهده تغییرات مورفولوژیک تیمار شده یا تیمار نشده با IC_{50} عصاره چای سبز، ابتدا پروماستیگوت‌ها در دور پایین $1000 \times g$ و برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس ماده رویی دور ریخته شد و باقیمانده آن در محلول PBS به صورت سوسپانسیون درآمدند سپس سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و در بزرگنمایی $100 \times$ و در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳، ۱۴).

تجزیه و تحلیل آماری:

با استفاده از نرم افزار EXCEL درصد *viability* سلول‌های کنترل و سلول‌های مواجه شده و با دارو با استفاده از این فرمول به دست آمد:

$$\text{Viable Cells \%} = [(A_T - A_B) / (A_C - A_B)] \times 100$$

به طوری که A_C ، جذب نوری سلول‌های کنترل، A_T جذب نوری سلول‌های درمان شده با چای سبز و گلوکانتیم A_B ، جذب نوری بلانک می‌باشد. در نهایت نتایج به صورت IC_{50} به وسیله رگرسیون خطی با استفاده از نرم افزار EXCEL محاسبه گردید. جذب نوری به دست آمده به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده و فعال مرتبط است (۱۳، ۱۴).

یافته‌ها

اثرات ضدلیشمانیایی عصاره گیاه چای سبز:

در این مطالعه از DMSO با غلظت ۱ درصد برای حل کردن عصاره چای سبز بهره گرفته شده است و احتمال سمیت این ماده به روش مستقیم میکروسکوپی و روش غیر مستقیم MTT برای پروماستیگوت‌ها بررسی شد و تغییر شکل ظاهری و یا مرگی در پروماستیگوت‌های تعدیل شده، مشاهده نگردید. از آزمایش MTT جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره چای سبز و گلوکانتیم و میزان زنده بودن (*Viability*) پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور ($MRHO/IR/75/ER$) و لیشمانیا اینفانتوم ($MCAN/IR/96$) (LONDON 49) به منظور یافتن IC_{50} استفاده شده است. اثرات ضد لیشمانیایی (IC_{50}) عصاره گیاه چای سبز و داروی کنترل گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بر روی رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در جدول ۱ و جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان IC_{50} عصاره چای سبز در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت $85 \mu\text{g/ml}$ ، $33/5 \mu\text{g/ml}$ و $19 \mu\text{g/ml}$ و $80/45 \mu\text{g/ml}$ ، $29/5 \mu\text{g/ml}$ و $12 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب برای پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد که این نشان از فعال بودن این عصاره علیه این انگل‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف

تترازولیوم (MTT) به یک محصول ارغوانی فورمازان نامحلول تبدیل می‌گردد. این واکنش احیا توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل صورت می‌پذیرد که به‌عنوان یک مؤلفه رشد و زنده بودن پروماستیگوت‌ها در برابر پاسخ دارویی بکار می‌رود، به طوری که کاهش در مقدار MTT احیا شده نشان دهنده سمیت دارو برای انگل می‌باشد. برای تهیه محلول استوک MTT، 5 mg از پودر زرد رنگ MTT (خریداری شده از شرکت Sigma) در یک میلی لیتر PBS حل و در 20°C نگهداری شد. محلول کار به طور تازه با مخلوط کردن یک حجم از محلول استوک MTT با ۹ حجم محیط کشت RPMI دارای $5/2 \%$ FCS تهیه و استفاده شد به طوری که غلظت نهایی MTT به $5/0 \text{ mg/ml}$ می‌رسید (۱۳-۱۵).

اضافه کردن پروماستیگوت‌ها، دارو و عصاره چای سبز:

$100 \mu\text{M}$ از سوسپانسیون‌های انگل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم که حاوی $10^6 \times 1 \text{ ml}$ سلول انگلی در هر میلی لیتر که در فاز لگاریتمی رشد هستند را به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه ای استریل به صورت سه بار تکرار (Triplicate) اضافه گردید به طوری که در هر چاهک میزان $10^5 \times 1$ پروماستیگوت قرار گیرد و به مدت ۶ ساعت انکوبه می‌کنیم تا انگل به شرایط جدید عادت کند. بعد از گذشت این مدت، رقت‌های مختلف ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۱۹۲ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره و داروی کنترل گلوکانتیم را تهیه و به میزان $10 \mu\text{M}$ از آن را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای به صورت تریپلیکیت اضافه گردید. علاوه بر این از شاهد (بلانک) که حاوی فقط $100 \mu\text{M}$ محیط کشت فاقد پروماستیگوت یا دارو است، استفاده شد. همچنین به دو چاهک دیگر فقط پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم به‌عنوان کنترل اضافه شد و میکروپلیت‌ها را در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط انکوباسیون قرار گرفتند. بعد اتمام زمان انکوباسیون، میکروپلیت‌ها را به مدت ۵ دقیقه با دور 1000 RPM سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را جدا و به باقیمانده $20 \mu\text{M}$ از محلول MTT کار به هر چاهک اضافه شد. چاهک کنترل منفی حاوی $100 \mu\text{M}$ محیط کشت و فقط $20 \mu\text{M}$ از محلول MTT می‌باشد. متعاقباً بعد از ۴-۳ ساعت انکوباسیون و سانتریفیوژ کردن آن محلول رویی را جدا و کریستال‌های فورمازان را با اضافه کردن $100 \mu\text{M}$ از DMSO به هر یک از چاهک‌ها حل کرده و خوب مخلوط می‌کنیم و بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری (Optical density, OD) را با دستگاه الایزا ریدر در طول موج 570 nm (فیلتر رفرنس 630 nm) قرائت شد. سپس میزان IC_{50} (Inhibitory concentration %50) یعنی غلظتی که ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌ها را مهار می‌کند، محاسبه گردید (۱۳ و ۱۶).

شکل میزان IC_{50} عصاره گیاه چای سبز و داروی گلوکانتیم نشان داده شده است. با توجه به این شکل پرومستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم حساسیت بیشتری را در مقایسه با لیشمانیا ماژور به عصاره گیاه چای سبز و داروی گلوکانتیم از خود نشان داده‌اند.

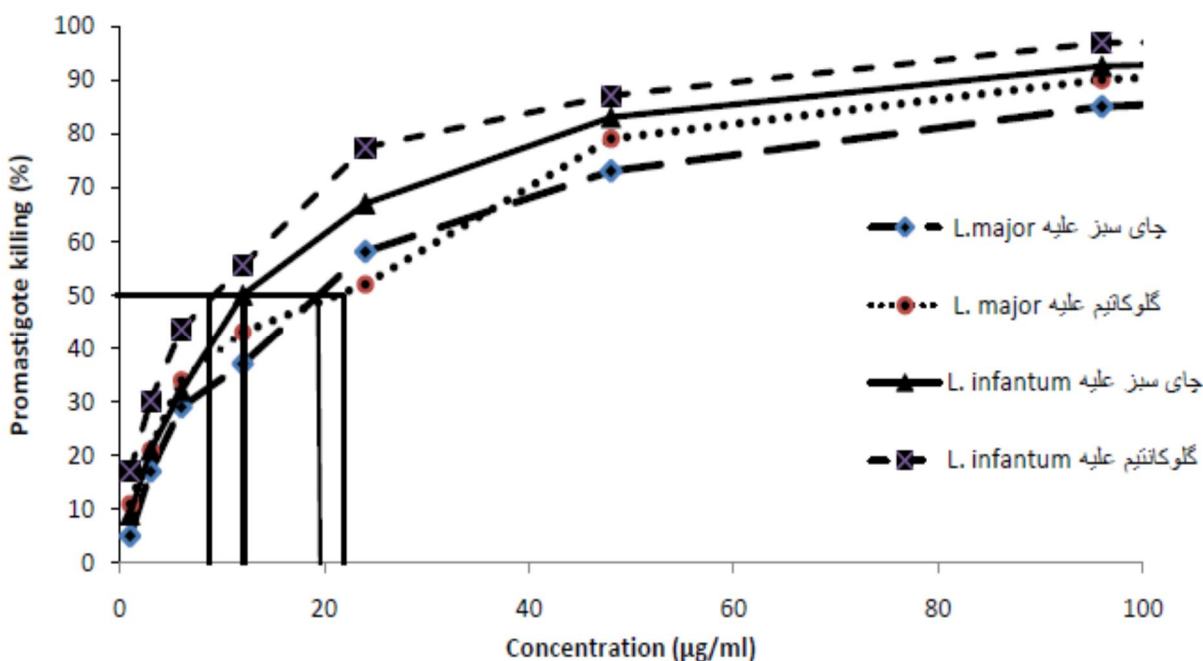
می‌باشد. به همین ترتیب IC_{50} های گلوکانتیم برای این دو گونه لیشمانیا در این جداول نشان داده است. درصد مرگ پرومستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چای سبز و داروی گلوکانتیم بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در شکل ۱ نمایش داده شده است. در این

جدول (۱): IC_{50} های عصاره چای سبز و داروی گلوکانتیم پس از ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون علیه پرومستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			نام ترکیب
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
۱۹	۳۳/۵	۸۵	عصاره گیاه چای سبز
۲۱/۸	۴۴/۵	۹۶/۷۶	گلوکانتیم

جدول (۲): IC_{50} های عصاره چای سبز و داروی گلوکانتیم پس از ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون علیه پرومستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم

IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			نام ترکیب
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
۱۲	۲۹/۵	۸۰/۴۵	عصاره گیاه چای سبز
۱۰/۱۶	۲۵	۷۵/۵	گلوکانتیم

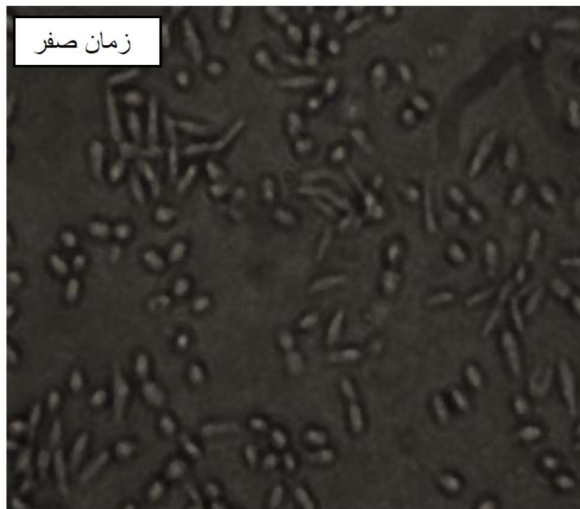


شکل (۱): درصد مرگ پرومستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چای سبز و داروی گلوکانتیم بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون. هر نقطه نمایشگر میانگین سه آزمایش مستقل می‌باشد.

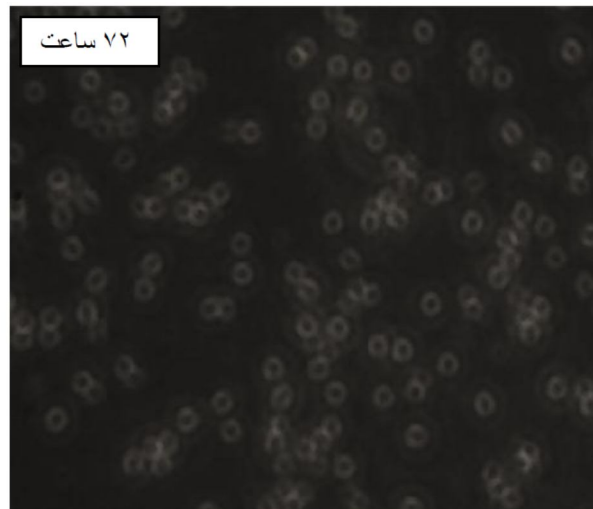
و در پایان ۷۲ ساعت تمام سلول‌ها شروع به چروکیدن (Cell shrinkage)، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم (Cytoplasmic condensation) و کوچک تر شدن کردند. هیچ گونه تغییری در پروماستیگوت‌های کنترل مشاهده نشد (شکل ۲).

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌ها:

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور مواجهه شده با غلظت $19 \mu\text{g/ml}$ (IC_{50}) عصاره چای سبز بررسی شد که پس از ۸ ساعت مواجهه شدن با عصاره تغییرات بروز کرده و



زمان صفر



۷۲ ساعت

شکل (۲): تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور در زمان صفر و ۷۲ ساعت پس از تیمار شدن با عصاره چای سبز

هستند. EGCG مهم‌ترین و فراوان‌ترین کانشین است که این ترکیب با اثر بر روی بیان تنظیم کننده‌های چرخه سلولی، باعث توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس می‌شود (۶- ۱۰ و ۱۸). پیش‌تر از این از چای سبز برای کنترل بیماری‌هایی چون پارکینسون، آلزایمر، آرتری و سرطان استفاده شده بود که این خواص بخاطر وجود ترکیبات پلی فنلیک آن است (۷- ۹). اخیراً فیلی همکاران مکانیسم‌های احتمالی فعالیت ضد لیثمانیایی چای سبز را مورد بررسی قرار دادند (۱۹) اما تا کنون مطالعه ای دقیق جهت تأیید این اثرات انجام نشده است. در این مطالعه اثربخشی عصاره گیاه *C. sinensis* بر روی سویه‌های استاندارد پروماستیگوت‌های انگل لیثمانیا ماژور و لیثمانیا اینفانتوم به کمک روش رنگ سنجی MTT بررسی شد. با بررسی نتایج دو سویه این نتیجه به دست آمد که پروماستیگوت‌های لیثمانیا اینفانتوم نسبت به پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور به این عصاره حساس تر هستند، با بالا بردن غلظت عصاره چای سبز و زمان تیمار شدن انگل‌ها با عصاره میزان اثربخشی نیز بیشتر شده یک رابطه مستقیم بین میزان غلظت عصاره و اثربخشی آن وجود دارد. همچنین مقایسه IC_{50} بین عصاره و داروی کنترل نشان می‌دهد که اثربخشی این عصاره بر روی لیثمانیا ماژور نسبت گلوکانتیم بیشتر است درحالی که نتایج به دست آمده درمورد لیثمانیا اینفانتوم برعکس می‌باشد. با توجه به اینکه عصاره گیاه چای سبز

بحث و نتیجه‌گیری

لیثمانیوز مجموعی از بیماری‌های انگلی است که به صورت طیف وسیعی از تظاهرات بالینی نظیر لیثمانیوز پوستی، پوستی-مخاطی و احشایی ایجاد می‌شود. اپیدمیولوژی و نشانه‌های بیماری به دلیل وجود فاکتورهای متعدد انگل، میزبان و محیط بسیار متغیر است. انگل لیثمانیا در مناطق مختلف ایران به صورت اندمیک وجود دارد که باتوجه به گونه انگل و علائم بالینی روش درمانی متفاوت است (۱). سمیت و مقاومت دارویی از مشکلات عمده مرتبط با دارو درمانی لیثمانیوز می‌باشد. به دلیل کاهش تأثیر داروهای خط اول در درمان لیثمانیوز (مثل ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌مون) و هزینه بالا و در دسترس نبودن داروهای خط دوم درمان (مثل آمفوتریسین B و میلتفوسین) بسیاری از محققین برآن شدند تا جایگزین مناسبی برای این دسته از داروها بیابند (۱۷). در بعضی از گیاهان ترکیباتی به نام فلاونوئیدها وجود دارد که ثابت شده است دارای ویژگیهای ضدتوموری، ضدباکتریایی، ضدانگلی و قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد هستند (۹ و ۱۰). ازجمله این گیاهان چای سبز است که حاوی مقادیر زیادی از فلاونوئیدهای مختلف است که یکی از انواع اصلی این فلاونوئیدها، کاتشین‌ها (catechin) هستند که این‌ها خود از زیرگروه پلی فنل‌ها هستند که دارای خواص ضدالتهابی، ضدموتازنی و آنتی‌اکسیدانتی در سیستم‌های مختلف بیولوژیک

ترکیب ضد لیشمانیایی بدانیم نیاز است این مطالعات صورت بگیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز بدلیل تأمین اعتبار طرح که پایان نامه خانم سودابه الله‌دین می‌باشد، تشکر و قدر دانی می‌گردد.

اثر مطلوبی بر روی پروماستیگوت‌های دو سویه لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم به‌صورت برون تنی از خود نشان داده است، با این حال ضرورت انجام آزمایشات بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا در مدل‌های حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود که این خود بزرگ‌ترین محدودیت این مطالعه می‌باشد چرا که فرم اصلی بیماری زای این انگل فرم داخل سلولی (آماستیگوت) آن می‌باشد و برای اینکه این عصاره را به‌عنوان یک

References:

1. WHO Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva; 2010.P.949, 22–26.
2. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis, J Infect Chemother, 2004; 10, 307-15.
3. Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad Med J 2006;82(972):649–57.
4. WHO. A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine: Harmonizing two approaches; 2000.P. 22-26.
5. Mak JC. Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise: Clin Exp Pharmacol Physio 2012; 39,265-73.
6. Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, Huo C, Chan TH, Dou QP. Recent advances on tea polyphenols. Front Biosci (Elite Ed) 2012;4:111–31.
7. Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Lett 2007;245(1-2):232–41.
8. Yang CS, Lambert JD, Ju J, Lu G, Sang S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. Toxicol Appl Pharmacol 2007;224(3):265–73.
9. Wu F, Sun H, Kluz T, Clancy HA, Kiok k, Costa K. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro: Life Sci 2006; 79, 2329-36.
10. Stuart EC, Scandlyn MJ, Rosengren RJ. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. Life Sci 2006;79(25):2329–36.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65(1-2):55–63.
12. Feily A, Saki J, Maraghi S, Moosavi Z, Khademvatan S, Siahpoosh A. In vitro activity of green tea extract against Leishmania major promastigotes. Int J Clin Pharmacol Ther 2012;50(3):233–6.
13. Khademvatan S, Adibpour N, Eskandari A, Rezaee S, Hashemitabar M, Rahim F. In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against Leishmania major and Leishmania infantum promastigotes. Exp Parasitol 2013;135(2):208–16.
14. Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-induced apoptotic cell death on Leishmania major and L. tropica strains. Korean J Parasitol 2011;49(1):17–23.
15. Poorrajab, F. Ardestani, S.K. Foroumadi, A. Emami, S. Kariminia, A. Behrouzi-Fardmoghadam, M. et al. Selective leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazole derivatives and possible mechanism of action against Leishmania species. Exp Parasitol 2009; 121, 323-30.

16. Khademvatan Sh, Saki J, Gharavi MJ, Rahim F. Allium sativum extract induces apoptosis in leishmania major (MRHO/IR/75/ER) promastigotes, J Med plants Res 2011; 16:3725-32.
17. Croft SL, Sundar, S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 19, 111-26.
18. Mac JC. Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise. Clin Exp Physiol, 2012; 39,265-73.
19. Feily A, Yaghoobi R, Namazi MR. The potential utility of green tea extract as a novel treatment for cutaneous leishmaniasis. J Altern Complement Med 2009; 15: 815-6.

IN VITRO ACTIVITY OF CAMELLIA SINENSIS EXTRACTS AGAINST L.MAJOR AND L.INFANTUM PROMASTIGOTES USING THE COLOROMETRIC MTT ASSAY

Sudabeh Allahdin¹, Shahram Khademvatan², Mahmoud Hashemitabar³, Alborz Eskandari^{4*}

Received: 11 Sep , 2014; Accepted: 21 Nov , 2014

Abstract

Background & Aims: Plant extracts and plant-derived compounds are unlimited sources of chemical diversity for identification of new medicinal agents that are commonly used to treat infectious diseases. The purpose of this study was to evaluate the in vitro antileishmanial activity of *camellia sinensis* extracts against *L. infantum* and *L. major* promastigotes by using colorimetric MTT assay as compared to the pentavalent antimonial compound (meglumine antimonite).

Materials & Methods: The extract was dried and dissolved in DMSO 1% solvent and further dilutions were obtained with RPMI 1640. Promastigotes of *L. major* and *L. infantum* were kept in RPMI 1640 medium with 10% of FCS. 100 µl of *leishmania major* or *leishmania infantum* promastigotes (1×10^6 cells/100µl) at logarithmic phase of treated with different concentrations of extract in two fold serial dilutions and after incubation time, MTT solution was added to each well in 96 well plate, then absorbance was read with ELISA reader in 570 nm.

Results: Daccordingly the data showed that camellia sinensis have leishmanicidal activity against *L.major* and *L.infantum* promastigotes. *C. sinensis* had IC₅₀ of 19 µg/ml for *L.major* promastigotes whereas for *L.infantum* with IC₅₀ of 12µg/ml after 72 h of incubation. Glucantime had IC₅₀s of 21.8 µg/ml, and 10.16 µg/ml for both strains, respectively.

Conclusion: This study revealed a new antileishmanial compound against promastigotes of *L. major* and *L. infantum* and proposes that *C. sinensis* has the capability of being used in leishmaniasis but further studies are required to find out its activity against intra-cellular form of *leishmania* (amastigote).

Keywords: *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Camellia sinensis*, MTT colorimetric assay

Address: Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. **Tel:** +989163545406

Email: alborz86pharmacist@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(10): 900 ISSN: 1027-3727

¹ MSc, Department of Parasitology, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Assistant Professor, Department of Myco-Parasitology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

³ Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran (Corresponding Author)