اثرات سایتوتوکسیک کیتوزان و عصاره‌ی اتانولی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) بر اشکال تاکی زوئیتی *Toxoplasma gondii* سویه *RH* در محیط آزمایشگاهی

سجاد معصومی فرد[۱]، آرش امین پور*[۲]، سهیل یوسف زاده ولنده[۳]، محمد فتاحی[٤]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰٤/۲۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۹/۰۲

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: توکسوپلاسموزیس یکی از متداول‌ترین عفونت‌های انگلی انسان و دیگر حیوانات خونگرم به شمار می‌آید. یکی از مشکلات اصلی توکسوپلاسموز، محدودیت درمانی آن است. درمان اصلی این انگل ترکیب سینرژیک پریمتامین و سولفودیازین می‌باشد که دارای عوارض جانبی بالایی هستند بطوریکه پریمتامین به علت تراتوژنیک بودن، در زنان حامله منع مصرف دارد. با توجه به خطرات زیادی که این انگل برای افراد با ایمنی ضعیف و زنان باردار ایجاد می‌کند، بنابراین تولید داروهای ضد توکسوپلاسما با اثربخشی بالا و عوارض جانبی کم از اهداف مهم تحقیقاتی توکسوپلاسماست. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سایتوتوکسیک کیتوزان و عصاره‌ی اتانولی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) بر اشکال تاکی زوئیتی *Toxoplasma gondii* سویه RH در محیط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: تاکی زوئیت سویه RH توکسوپلاسما گوندی با غلظت‌های ۴۵، ۹۰ و ۱۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره اتانولی زرین گیاه و غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان و نیز ترکیبات این غلظت‌ها در مقایسه با داروی کنترل مثبت (پریمتامین) و کنترل منفی در مدت‌زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون به‌طور جداگانه مجاورت و سپس با روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و نیز MTT، درصد کشندگی عصاره و کیتوزان با تعیین نسبت تاکی زوئیت‌های مرده در مقایسه با کنترل با انجام سه‌گانه تمامی مراحل بررسی شد.

نتایج: به‌طورکلی بعد از گذشت ۴۸ ساعت از انکوباسیون در تست تریپان بلو، غلظت ۱۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرین گیاه، ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان و نیز ترکیب غلظت ۹۰ عصاره با ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان در مقایسه با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی کنترل با درصد کشندگی به ترتیب: ۵۰/۹، ۷۷/۲، ۸۸/۳ و ۹۵/۲ و نیز بررسی نتایج الیزا در تست MTT با OD به ترتیب: ۰/۱۹۸، ۰/۰۸۷، ۰/۰۶۷ و ۰/۰۴۸ نتایج قابل قبولی را از خود نشان دادند. بطوریکه بعد از گذشت ۷۲ ساعت تقریباً در غلظت‌های ذکرشده به‌طور میانگین تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما بیشتر از ۸۰درصد نابود شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که، عصاره کیتوزان و به‌ویژه ترکیب آن با عصاره زرین گیاه در مقایسه با داروی کنترل مثبت پریمتامین و نیز کنترل منفی نتایج قابل قبولی را از خود نشان داده و اثرات سیتوتوکسیتی ترکیب این دو دارو به‌طور هم‌زمان بیشتر بود.

کلیدواژه‌ها: توکسوپلاسما گوندی، کیتوزان، عصاره زرین گیاه، توکسوپلاسموز، تاکی زوئیت

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره دهم، ص ۸۰۱-۷۹۲ ، دی ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۵۳۳۷۳

Email: arashaminpour@gmail.com

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی (*Toxoplasma gondii*) انگل داخل سلولی اجباری از رده کوکسیدیاها می‌باشد که این انگل در همه سلول‌های هسته‌دار میزبانان مهره‌دار تکثیر می‌یابد و میزبان اصلی آن گربه می‌باشد. انسان در اثر خوردن کیست نسجی گوشت خام یا نیم‌پز (مخصوصاً گوشت گاو و خوک) و خوردن اووسیست بالغ در غذا یا آب آلوده به مدفوع گربه یا انتقال از طریق جفت آلوده می‌شود (۱،۲). توکسوپلاسموزیس در اشکال مختلف از یک عفونت خود محدود شونده بدون علامت گرفته تا یک بیماری کشنده در بیماران با عفونت مادرزادی و بیماران دارای شرایط خاص مشاهده می‌گردد.

[۱] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] دانشجوی کارشناسی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[٤] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

با فعال شدن سیستم ایمنی، توکسوپلاسما به‌صورت کیست نسجی باقی‌مانده و به‌صورت آهسته در بدن میزبان تکثیر و عفونت فاز مزمن را به وجود می‌آورد (۳،۴). مطالعات درباره‌ی شیوع توکسوپلاسموزیس نشان می‌دهد این انگل گسترش جهانی داشته و در کشورهای مختلف ازجمله در ایران یک انگل شایع است و تقریباً ۳۰درصد افراد در اکثر نقاط ایران به این انگل آلوده می‌باشند (۵،۶). یکی از مشکلات اصلی توکسوپلاسموز، محدودیت درمانی آن می‌باشد. داروهای فعلی که بر ضد توکسوپلاسما استفاده می‌شود علاوه بر داشتن اثرات سوء جانبی، توانایی از بین بردن انگل‌های داخل کیست و ریشه‌کنی عفونت را ندارند. داروی انتخابی توکسوپلاسموز ترکیب سینرژیک پیریمتامین و سولفانامید می‌باشد (۷،۸). از اولویت‌های تحقیقاتی توکسوپلاسما دستیابی به داروی ضد توکسوپلاسما با تأثیرگذاری مطلوب و با کم‌ترین عارضه جانبی است. فراورده‌های به‌دست‌آمده از گیاهان دارویی یکی از این گزینه‌هاست که در طب سنتی نیز درباره اثرهای ضد انگلی برخی از این گیاهان اشاره‌هایی شده است (۹). استفاده از ترکیبات طبیعی برای درمان بیماری‌ها سابقه طولانی دارد، امروزه بااینکه قسمت عمده داروها منشأ شیمیایی دارند اما برآورد شده است که حدود یک‌سوم کلیه فرآورده‌های دارویی منشأ گیاهی داشته یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته‌اند (۱۰،۱۱). در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و درنتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران امکان شناسایی مواد مؤثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آن‌ها به‌منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد، این کار به‌ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کم‌تر موردبررسی قرار گرفته‌اند، اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۲،۱۳). زرین گیاه با نام علمی (*Dracocephalum kotschyi*) گیاهی علفی، چندساله و اندمیک ایران از خانواده نعناع است .این گیاه حاوی رزماریک اسید می‌باشد که دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد فسادپذیری و آنتی اکسیدانی می‌باشد. همچنین تحقیقات اخیر دارویی نشان داده است که فلاونوئید متوکسی موجود در پیکره رویشی گیاه خاصیت ضدسرطانی نیز دارد (۱۴). در گذشته در طب سنتی برای اختلالات معده، کبد و سردرد استفاده شده است. بررسی عصاره متانولی این گیاه در برابر سه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اروئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریامونوسیتوژنز*) و سه باکتری گرم منفی (*Escherichia coli، Salmonella enterica، Enterica aerogenes*) نشان داده که *Dracocephalum* دارای فعالیت ضدباکتریایی خوبی است (۱۵،۱۶). یکی دیگر از یافته‌های نوین علوم پزشکی در سالهای اخیر استفاده از ترکیبات کیتوزان در درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد که نتایج نوید بخشی را در درمان انواع مختلف بیماری‌ها نشان داده است. کیتوزان پلیمر ترکیبی گلوکز آمین و ان-استیل گلوکز آمین است که به وسیله پیوندهای ۱ و ۴ گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند، به عبارتی مشتقی از گلوکان با واحدهای تکرار شونده کیتین است. کیتین یک موکو پلی ساکارید طبیعی با فرمول شیمیایی (C8H13NO5) بوده که به وفور در اسکلت خارجی بندپایان مانند میگو، خرچنگ و همچنین گیاهان پست از قبیل مخمرها و کوتیکول حشرات یافت می‌شود. اهمیت کیتین در تهیه کیتوزان از آن جا است که کیتوزان در فراورده‌های بالینی به دلیل سازگاری زیست‌شناسی با بقیه مواد، قابلیت هضم آسان، غیر سمی بودن، قدرت جذب بالا، و در دسترس بودن به‌عنوان یک حامل داروئی به کار می‌رود (۱۷،۱۸). به‌دلیل خواص منحصربه‌فرد کیتوزان، کاربرد آن در صنایع مختلف ازجمله زیست فناوری، دارویی و پزشکی، بهسازی فاضلاب، آرایشی و صنایع غذایی گزارش شده‌است. کیتوزان با درجه خلوص مناسب در سیستم‌های آزادسازی و رهایش دارویی، همودیالیز، پوست مصنوعی، مشمع‌های دارویی، بی حرکتی آنزیمی، لنزهای تماسی، بانداژ چشم، ارتوپدی، نخ جراحی، دندان پزشکی و کشاورزی به کار رفته و علاوه بر آن اثراتی چون توانایی جذب چربی، کاهش گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید و ضد میکروبی نیز آن گزارش شده‌است. فیلم‌های کیتوزانی، فیبرها، میکرو ذرات و نانو ذرات کیتوزانی برای مهندسی بافت، انتقال دارو، واکسینه کردن و انتقال DNA کاربرد دارند. در حال حاضر، کیتوزان در علوم پزشکی و صنایع غذایی به‌دلیل خواص ضد باکتریایی، ضدقارچی، ضد توموری و عملکرد هیپوکلسترومیک مورد توجه است (۱۹،۲۰). نتایج تحقیقات در چند سال اخیر نشان می‌دهد که کیتوزان روی ژیاردیا، لیشمانیا و لارو حشرات اثر کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارند با این حال تحقیقات کم‌تری برای استفاده از کیتوزان در بیماریهای انگلی انجام شده‌است. (۲۱،۲۲). در ایران مطالعات کمی روی خواص زیست فعال این منابع ارزشمند انجام گرفته است و مطالعات متعدد در این زمینه ضروری می‌باشد براین اساس هدف از این مطالعه بررسی اثرات سایتوتوکسیک کیتوزان و عصاره‌ی اتانولی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) بر اشکال تاکی زوئیتی *Toxoplasma gondii* سویه RH در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌ی گیاهی: گیاه مورد مطالعه تهیه و توسط متخصص گیاه شناسی در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه شناسایی شد. از این گیاه یک نمونه در پژوهشکده ثبت و نگهداری شد. عصاره گیری تحت نظارت متخصص فارماکوگنوزی انجام شد. به‌طور خلاصه، اندام‌های هوایی گیاه در دمای اتاق و سایه خشک شدند و سپس آسیاب شد. از برگ‌های

خشک شده زرین گیاه استفاده شد. مواد گیاهی موقع عصاره گیری به‌صورت پودر درآمده و در یک ظرف شیشه‌ای با دی اتیل اتر به مدت ۲۴ ساعت عصاره گیری و سپس عصاره دی اتیل اتری در زیر هود برای نیم ساعت خشک شد. سپس از اتانول برای حل نمودن فلاونوئید های موجود استفاده و عصاره حاصل فیلتر شده و بعد از تبخیر اتانول توسط روتاری، عصاره سیال نهایی آماده شد.

آماده سازی کیتوزان: کیتوزان به‌صورت تجاری (C8H13NO5) با کد ۴-۷۶-۹۰۱۲ خریداری شد و حدود نیم گرم کیتوزان زنجیره سبک به ۲۰۰ سی سی آب اضافه و سپس ۲ سی سی اسیداستیک گلایسیال اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد و بعد به حجم ۱ لیتر رسانده شد.

تهیه داروی کنترل مثبت (پریمتامین): قرص پریمتامین با خلوص ۹۸ درصد به وزن ۲۵۰ میلی‌گرم از شرکت Labesfal به شماره N056918 تهیه شد. این دارو به نسبت ۱:۱ با محیط کشت RPMI حل و غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو به‌دست آمد. از این غلظت به‌عنوان محلول ذخیره استفاده شد.

آماده سازی غلظت‌ها: از داروهای مورد مطالعه (زرین گیاه، کیتوزان و پریمتامین) با استفاده از محیط کشت PPMI غلظت‌های مورد نظر که به ترتیب برای زرین گیاه ۴۵، ۹۰ و ۱۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، برای کیتوزان ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نیز ۵۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای داروی پریمتامین جهت کنترل مثبت مطالعه به‌دست آمد و برای ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه، تکثیر و آماده سازی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی :در مطالعه حاضر از تاکی زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسما گوندی ای استفاده شد .این سویه از تانک ازت گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تهیه و به طریق داخل صفاقی در موش‌های سوری تکثیر داده شد . تاکی زوئیت‌ها از طریق شستشوی صفاقی با نرمال سالین جمع‌آوری و بلافاصله با دور ۲۰۰g به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا خلوص تاکی زوئیت‌های عاری از سلول افزایش یابد. سپس مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ به داخل لوله دیگر منتقل و با دور ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ سه مرتبه با PBS (بافر فسفات سالین) استریل با دور ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از آخرین مرحله شستشو با PBS رقیق و با لام نئوبار تعداد تاکی زوئیت‌های آن شمارش شد. در نهایت سوسپانسیون حاوی 10^5 تاکی زوئیت در میلی‌لیتر آماده و برای انجام آزمایش‌ها ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین درصد مرگ سلولی به روش تریپان بلو: بدین ترتیب که تاکی زوئیت‌ها با درشت نمایی ۴۰ شی ای شمارش و نسبت تعداد تاکی زوئیت‌های کشته شده (رنگ گرفته) به تعداد کل تاکی زوئیت‌ها برای هر یک از عصاره‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف انکوباسیون محاسبه شد. از سوسپانسیون تاکی زوئیت‌ها در PBS بعنوان کنترل منفی و نیز محیط کشت PBS+RPMI برای کنترل استفاده شد .تمامی آزمایشات به‌صورت سه‌گانه انجام و میانگین برای هر مورد تعیین گردید.

تعیین درصد مرگ سلولی به روش MTT: از انگل‌های موجود در محیط کشت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هر چاهک پلیت به‌صورت Duplicate اضافه شد. بطوری که در هر چاهک تعداد ۱۰ هزار انگل موجود باشد. سپس از عصاره‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه کرده و به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵درصد انکوبه می‌شود. بعد از گذشت مدت انکوباسیون به میزان ۱۰درصد حجم هر چاهک از محلول MTT به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در شرایط تاریک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده، سپس میکروپلیت سانتریفیوژ (۱۵۰۰ دور در ۵ دقیقه) شده و بعد از تخلیه مایع رویی به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO اضافه گردید و در نهایت دانسیته نوری نمونه‌ها (Optical Density=OD) با استفاده از دستگاه میکروپلیت الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰nm و طول موج رفرنس ۶۳۰ nm قرائت شد. با استفاده از OD های به‌دست آمده،Viability، با در نظر گرفتن مقدار کنترل مثبت و منفی و مقایسه آن‌ها با نتایج به‌دست آمده از تأثیر عصاره‌های مورد نظر با فرمول زیر محاسبه شد.

[تعداد سلول‌های زنده/کل سلول‌ها] ×۱۰۰ =سلول‌های زنده

سلول‌های مرده = سلول‌های زنده – کل سلول‌ها

تمامی آزمایشات به‌صورت سه‌گانه انجام و میانگین برای هر مورد تعیین گردید.

آنالیز آماری: داده‌ها با نرم‌افزار SPSS16 و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز شد و سطح معنی داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به تست تریپان بلو:

میانگین انگل‌های مرده پس از اضافه کردن عصاره گیاهی و داروی شیمیایی در زمان‌های مختلف در جدول ۱ آمده است . به‌طورکلی تعداد انگل‌های مرده در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن داروها در مقایسه با کنترل منفی که هیچ دارویی دریافت نکرده بودند، اختلاف معنی داری نشان داد ($P<0/05$). با

توجه به مجاورت عصاره زرین گیاه و کیتوزان و نیز ترکیب هم‌زمان این دو باهم در برابر تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی و شمارش سلول‌های مرده که رنگ گرفته‌اند و به‌دست آوردن درصد کشندگی، در مدت‌زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون: طبق جدول شماره یک، عصاره زرین گیاه در غلظت ۱۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، داروی کیتوزان در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نیز ترکیب این دو باهم در غلظت‌های ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرین گیاه و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان توانستند در ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون بالای ۵۰درصد اثر کشندگی از خود نشان دهند که از نظر کاهش در تعداد انگل دارای اختلاف معنی داری بودند ($P<0/05$). این در حالی است که طبق برسی ها کیتوزان و نیز ترکیب آن با زرین گیاه در مقایسه با داروی پریمتامین نتایج نزدیک بهم و خوبی داشته و به‌طور میانگین بالای ۸۰درصد اثر کشندگی داشتند که این نتایج در ۷۲ ساعت بعد از انکوباسیون در غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از زرین گیاه و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان به‌طور هم‌زمان باهم و نیز کیتوزان به تنهایی در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر علیه توکسوپلاسما بیشترین درصد کشندگی در مقایسه با پریمتامین در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب: ۹۰/۴درصد، ۸۵/۷درصد و ۹۶/۴درصد بود و دارای اختلاف معنی داری بودند ($P<0/05$) و در سایر غلظت‌ها این اختلاف معنی دار مشاهده نشد ($P<0/05$).

نتایج مربوط به تست MTT:

با توجه به بررسی‌های انجام گرفته در تست MTT و خوانش OD (جذب نوری) مربوط به سلول‌های زنده مجاور داده شده عصاره زرین گیاه و کیتوزان در مقایسه با پریمتامین بعنوان داروی کنترل مثبت بر علیه تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی که در جدول شماره ۲ با جزئیات مشخص است، نتایج مربوط به تست تریپان بلو را تأیید می‌کند به‌طوری که بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت از انکوباسیون در غلظت‌های ۱۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از زرین گیاه، ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از کیتوزان و نیز ترکیب این دو در غلظت‌های ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرین گیاه و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان، کم‌تر از ۵۰درصد سلول‌های انگلی زنده بودند که از نظر کاهش در تعداد انگل دارای اختلاف معنی داری بودند ($P<0/05$). این در حالی است که بعد از ۷۲ ساعت از انکوباسیون به در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان و نیز ترکیب غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرین گیاه با ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان و نیز ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پریمتامین به‌طور میانگین کم‌تر از ۲۰درصد سلول زنده مشاهده شد و در کم‌ترین درصد سلول زنده با OD هایی به ترتیب ۰/۰۸۴، ۰۲۶/. و ۰/۰۲۲ برای غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان، ترکیب غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زرین گیاه و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان در مقایسه با پریمتامین در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بعد از ۷۲ ساعت از انکوباسیون بود و دارای اختلاف معنی داری بودند ($P<0/05$) و در سایر غلظت‌ها این اختلاف معنی دار مشاهده نشد ($P<0/05$).

جدول (۱): درصد سلول‌های مرده رنگ گرفته با تست تریپان بلو مربوط به عصاره زرین گیاه، کیتوزان و ترکیب این دو باهم در مقایسه با پریمتامین و کنترل منفی و کنترل در غلظت و مدت زمان تعیین شده

دارو	کیتوزان			زرین گیاه			ترکیب (کیتوزان + زرین گیاه)									پریمتامین (کنترل مثبت)			کنترل (انگل	کنترل (PBS)
غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) / ساعت	۱۵۰	۳۰۰	۶۰۰	۴۵	۹۰	۱۳۵	۱۵۰ + ۴۵	۱۵۰ + ۹۰	۱۵۰ + ۱۳۵	۳۰۰ + ۴۵	۳۰۰ + ۹۰	۳۰۰ + ۱۳۵	۶۰۰ + ۴۵	۶۰۰ + ۹۰	۶۰۰ + ۱۳۵	۵۰	۲۰۰	۵۰۰	۵۰ میکرو لیتر + ۵۰ میلی‌لیتر	۵۰
۲۴	۴۸/۷×	۶۰/۱×	۸۲/۶×	۲۸/۲	۳۳/۲	۴۲/۲×	۵۴/۲×	۷۸/۲×	۴۳/۲×	۴۸/۲×	۴۵/۲×	۳۸/۳	۳۲/۳	۲۸/۲	۶۷/۲×	۶۷/۲	۷۱/۳	۹۲/۳	۹/۳	۱۰۰
۴۸	۴۹/۱	۶۱/۲	۷۷/۲	۲۹/۳	۳۵/۸	۵۰/۳	۵۵/۱	۸۸/۳	۴۴/۱	۴۹/۱	۴۵/۸	۳۹/۲	۳۸/۲	۳۰/۳	۷۰/۶	۷۲/۹	۷۸/۹	۹۵/۲	۱۰/۸	۱۰۰
۷۲	۵۴/۲	۶۲/۳	۸۵/۷	۳۰/۶	۳۷/۹	۵۱/۹	۶۰/۶	۹۰/۴	۴۵/۴	۵۰/۹	۴۸/۳	۴۰/۱	۳۹/۱	۳۲/۷	۷۳/۴	۸۱/۲	۸۷/۳	۹۶/۴	۸/۲	۱۰۰

$P<0/05$ ×

جدول (۲): OD سلول‌های زنده خوانش شده با الیزا در تست MTT مربوط به عصاره زرین گیاه، کیتوزان و ترکیب این دو باهم در مقایسه با پریمتامین و کنترل منفی و کنترل در غلظت و مدت زمان تعیین شده

دارو	کیتوزان			زرین گیاه			ترکیب (کیتوزان + زرین گیاه)						پریمتامین (کنترل مثبت)			کنترل (انگل+)	کنترل (PBS)
غلظت (میلی لیتر/میلی ساعت)	۱۵۰	۳۰۰	۶۰۰	۴۵	۹۰	۱۳۵	+ ۴۵	+ ۹۰	+ ۱۳۵	۱۵۰ + ۴۵	۱۵۰ + ۹۰	۱۵۰ + ۱۳۵	۵۰ + ۱۳۵	۲۰۰ + ۹۰	۵۰۰ + ۴۵	۵۰ میکرو لیتر	۵۰ میکرو لیتر + ۵۰ میکرو لیتر
۲۴	۵۲.۱۱	۲۷.۸۰	۱۸.۰۴	۸۸.۵۸	۶۶.۶۶	۳۷.۲۰	۳۴.۴۳	۲۲.۲۸	۴۰.۸۸	۴۰.۸۸	۳۶.۳۷	۳۶.۲۷	۴۶.۹۶	۵۵.۰۶	۲۷.۹۹	۳۴.۸۰	۱۷.۸۶	۹.۵۷	۰/۵۴۳	۱.۴۷
۴۸	۵۰.۷۱	۲۶.۵۱	۱۵.۴۸	۸۲.۲۰	۵۷.۱۱	۳۵.۰۵	۲۹.۳۵	۱۱.۹۲	۳۸.۲۵	۳۳.۶۹	۳۴.۶۹	۴۸.۲۲	۴۶.۲۶	۵۱.۹۵	۲۱.۵۳	۳۲.۹۱	۱۵.۴۸	۸.۵۴	۰/۵۶۲	۱.۷۷
۷۲	۴۸.۷۸	۲۲.۲۹	۱۴.۶۳	۸۱.۰۱	۵۵.۵۷	۳۲.۵۷	۲۷.۵۲	×۴.۵۲	۳۶.۵۸	۳۱.۱۴	۳۲.۶۱	۴۶.۸۶	۴۴.۲۵	۵۰.۶۹	۱۸.۸۱	۳۰.۳۱	۱۵.۶۷	۵.۵۷	۰/۵۷۴	۱.۵۶

بحث

توکسوپلاسما گوندی جزو تک یاخته‌های اجباری درون سلولی از شاخه اپی کمپلکسا و شایع‌ترین انگل عفونی در انسان و بسیاری از جانداران خونگرم می‌باشد، توکسوپلاسموز انتشار جهانی داشته که شامل یک سوم جمعیت جهان بخصوص در کشورهای توسعه یافته می‌باشد (۲۳). تحقیقات فراوانی جهت معرفی یک ترکیب جدید، مؤثر و بی خطر برای درمان توکسوپلاسموزیس حاد و به خصوص توکسوپلاسموزیس مزمن انجام و یا در حال انجام است (۲۶). فراورده‌های به‌دست آمده از گیاهان دارویی یکی از این گزینه‌هاست. بطوری که معمولاً در بسیاری از کشورها از گیاهان بومی برای درمان اغلب بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود (۲۷). سازمان بهداشت جهانی در نظر دارد تحقیقات بیشتری در زمینه استفاده از گیاهان برای پیدا کردن فراورده‌های دارویی جدیدتر، بهتر و کاراتر با سمیت کم‌تر بهره گیرد (۲۸). زرین گیاه بانام علمی (Dracocephalum kotschyi) گیاهی علفی، چندساله و اندمیک ایران از خانواده Labiaceae است و در آسیای میانه و اروپا یافت می‌شود ودر ایران عمدتاً درمناطق مرکزی و شمالی ایران یافت می‌شود (۳۰، ۲۹). در مطالعه حاضر، اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره زرین گیاه و کیتوزان و نیز ترکیب این دو به‌طور هم‌زمان از طریق مجاورت مستقیم آن‌ها با تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما در محیط آزمایشگاهی ارزیابی شد و طبق نتایج به‌دست آمده ترکیب این دو دارو باهم بهتر از تأثیر زرین گیاه و کیتوزان به‌صورت جداگانه در مقایسه با داروی پریمتامین بود. این در حالی است که در مقایسه تأثیر عصاره گیاهی و کیتوزان به‌طور جداگانه، کیتوزان اثربخشی بیشتری را در از بین بردن تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما از خود نشان داد که این نتایج احتمالاً به دلیل ترکیبات موجود در این داروها و اثرات سینرژیک آن‌ها بر انگل بوده است. به نظر می‌رسد که اثر کشندگی عصاره‌ها متفاوت از داروهای رایج ضد توکسوپلاسما باشد. داروی پریمتامین از طریق مهار آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز سبب تداخل در سنتز تترا هیدروفولیک اسید از فولیک اسید می‌شود. شناسایی مکانیسم عمل کشندگی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما توسط عصاره‌های گیاهی به تحقیقات تکمیلی نیاز دارد. روشن شدن مکانیسم عمل عصاره‌ها، مستلزم شناسایی و جداسازی ترکیبات آن‌ها و بررسی اثر ضد توکسوپلاسمایی هر یک به‌طور جداگانه می‌باشد. هر چند که در برخی مطالعات اثر ضد توکسوپلاسمایی فراکشن های برخی از عصاره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است و فراکشن هایی با اثربخشی بیشتر شناسایی شده است ولی مطالعات تکمیلی به‌منظور شناسایی مولکول‌های مؤثر و مکانیسم عمل آن‌ها به‌منظور دستیابی به یک داروی جدید ضد توکسوپلاسما نیاز است (۳۱). یکی از کاربردهای احتمالی عصاره‌های گیاهان دارویی با اثر ضد توکسوپلاسمایی، استفاده از آن‌ها در پیشگیری از توکسوپلاسموز مادرزادی و فعال شدن مجدد توکسوپلاسما در بیماران با اختلال یا تضعیف ایمنی است. جنین مادران سرونگاتیو توکسوپلاسما، مبتلایان به ایدز و افراد تحت درمان داروهای سرکوب کننده ایمنی گروه‌های در معرض خطر بالای توکسوپلاسموز می‌باشند. پیشگیری از توکسوپلاسموز در این افراد بسیار اهمیت دارد (۳۲). به‌طور مثال در مطالعات گذشته، کمالی و همکاران درسال ۲۰۱۵ روی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف از Dracocephalum kotschyi در برابر میکروارگانسیم های بیماری زای مواد غذایی پرداختند. در این مطالعه به بررسی ویژگی ضد باکتریایی عصاره متانولی در برابر سه باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اروئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریامونوسیتوژنز) و سه باکتری گرم منفی (Escherichia coli،Salmonella enterica Enterica aerogenes) انجام گرفته است. حداقل غلظت مهاری انواع عصاره بین ۰/۷۸۱-۲۵ میلی‌گرم

درمیلی‌لیتر بود که نتایج این تحقیق نشان داد که Dracocephalum kotschyi دارای فعالیت ضدباکتریایی خوبی است (۳۳). در مقابل غفار و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثرات ضدتوکسوپلاسمایی نانوذرات کیتوزان و نقره پرداختند. این بررسی از طریق مطالعه چگالی انگلی و تغییرات فراساختاری انگل و برآورد اینترفرون گامای سرم بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره که به تنهایی یا با کیتوزان ترکیب می‌شوند دارای قابلیت‌های ضد توکسوپلاسمای امیدوارکننده‌ای هستند بطوریکه حیواناتی که این ترکیبات را دریافت کرده‌اند، در مقایسه با گروه کنترل مربوطه، از نظر آماری کاهش معنی داری در تعداد شمارش انگلی در کبد و طحال نشان می‌دهند. مطالعه میکروسکوپی از ترشحات صفاقی حیوانات، توقف حرکت و تغییرشکل تاکی زوئیت‌ها را نشان داد، علاوه بر این، اینترفرون گاما در سرم حیوانات دریافت کننده این ترکیبات افزایش یافت در نتیجه این نانوذرات تأثیر خود را در برابر عفونت تجربی توکسوپلاسما ثابت کردند (۳۴). در مطالعه‌ی دیگری که توسط یونس نیا و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام گرفته، به بررسی اثر ضد انگلی کیتوزان بر علیه تریکوموناس واژینالیس پرداختند. طبق نتایج به‌دست آمده از غلظت‌های مختلف (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شده بهترین درصدهای به‌دست آمده به جهت درمان به ترتیب ۲۴/۴ و ۶۴/۵۶ بوده است. این نتایج نشان از تأثیر قابل قبول کیتوزان بر علیه انگل‌ها دارد (۳۵). طبق مطالعات صورت گرفته توسط موسوی وهمکاران درسال ۲۰۱۸ اثرات ضدباکتریایی و ضد قارچی نانوذرات کیتوزان بر تهویه مطبوع بافتهای پروتزهای کامل مورد بررسی قرار دادند. به این صورت که پس از کشت میکروارگانسیم های باکتریایی و قارچی، سوسپانسیون‌های به‌دست آمده به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت انکووبه شدند و میزان رشد میکروارگانسیم ها در محیط کشت با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. غلظت‌های مختلف نانوذرات منجر به مهار رشد قارچها وباکتری ها در هر دو ۲۴ و ۴۸ ساعت شدند (۳۶). برطبق مطالعات آلبورکنگو (Alburquenque) درسال ۲۰۱۰ به بررسی فعالیت ضد قارچی کیتوزان باوزن ملکولی کم دربرابرایزوله بالینی گونه کاندیدا پرداختند. حداقل غلظت مهارکننده آزمایشگاهی کیتوزان و فلوکونازول با استفاده از روش میکرودایلوشن اندازه گیری شد. کیتوزان باوزن ملکولی کم فعالیت ضد قارچی مهمی را به نمایش گذاشت وبیش از ۸۹/۹ درصد از ایزوله‌های بالینی مورد بررسی را مهار کرد و ۶۸/۶ درصد را به‌طور کامل ازبین برد. فعالیت ضد قارچی بیشتری از کیتوزان با وزن ملکولی کم در pH=4 مشاهده شد. این اولین گزارشی است که در آن فعالیت ضد قارچی کیتوزان باوزن ملکولی کم درمورد کاندیدا است. استفاده از کیتوزان با وزن ملکولی کم به‌عنوان ترکیب ضد قارچی چشم انداز درمانی جدیدی را باز می‌کند زیرا سمیت کم برای انسان دارد (۳۷). در سال ۲۰۱۹ نانسی و همکارانش به مقایسه تأثیر داروی اسپیرامایسین در برابر نانو ذرات کیتوزان و اسپیرامایسین بر روی توکسوپلاسما گوندی به‌صورت درون تنی پرداختند که این اثر بخشی را با میزان بقای موش‌های آلوده در گروه‌های مختلف و نیز بررسی میکروسکوپی آلودگی‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج به‌دست آمده از بقای ۲۰۰ روزه موش‌های تیمار شده با ترکیب اسپیرامایسین با نانوذرات کیتوزان و نیز کاهش ۹۰درصد ای آلودگی به توکسوپلاسما در کبد را نشان می‌دهد این در حالیست که در گروه‌های اسپیرامایسین حرکت در توکسوپلاسماها فقط کند می‌شود. با توجه به ماهیت غیر سمی بودن ترکیبات نانوذرات کیتوزان با اسپیرامایسین و نیز بالاترین اثربخشی مدنظر می‌تواند بعنوان داروی پیشنهادی با بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گیرد (۳۸). در مطالعه‌ای دیگر چراغی پور و همکارانش در سال ۲۰۲۰ تاثیرات کیتوزان به همراه نانوذرات علیه توکسوپلاسما گوندی در مقایسه با داروی کنترل یعنی پریمتامین به‌صورت مطالعه سیستماتیک ریویو پرداختند که این مطالعه از سال ۱۹۹۲ تا ۲۰۱۹ را شامل می‌شود. از بررسی ۲۵۰۰ مطالعه به ۹ مطالعه که دارای شرایط مورد نظر بوده رسیدند که از این بین ۵ مورد داخل بدن و ۱ مورد خارج از بدن و ۳ مورد نیز ترکیب هردو آزمایش بودند. بررسی‌ها نشان داد که با توجه به سمیت کم و قدرت مهاری بالای کیتوزان در برابر توکسوپلاسما گوندی، نانوذرات کیتوزان به‌عنوان یک درمان جایگزین برای این عفونت‌های انگلی پتانسیل را نشان می‌دهد (۳۹). با توجه به بررسی این مطالعات و نیز مقایسه نتایج حاصل با مطالعه حاضر که به ۲ روش تریپان بلو و نیز تأیید نتایج به‌دست آمده با روش MTT و خوانش جذب نوری سلول‌های زنده، می‌توان به تأثیر این عصاره گیاهی، کیتوزان و به ویژه ترکیب این دو دارو هم‌زمان باهم بر روی انگل توکسوپلاسما گوندی بسیار امیدوارکننده دانست و به بررسی بیشتر و تخصصی‌تر در این زمینه پرداخت. در پژوهش حاضر اثر توام عصاره گیاهی زرین گیاه و کیتوزان نتایج قابل قبولی داشت که می‌تواند در تولید و جایگزینی داروی طبیعی از این ترکیبات به جای داروهای شیمیایی موجود گزینه مناسبی باشد. با این حال مطالعات تکمیلی در خصوص نحوه عمل عصاره زرین گیاه و کیتوزان و نیز تأیید در شرایط *in vivo* خواهد توانست تأیید کننده پژوهش حاضر باشد.

نتیجه‌گیری

از مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که هر یک از عصاره گیاهی و به‌ویژه داروی کیتوزان در مقایسه با داروی کنترل پریمتامین نتایج قابل قبولی را از خود نشان دادند. این در حالی است که ترکیبات این دو دارو هم‌زمان باهم تأثیر بیشتری را بر رو تاکی زوئیت‌های

توکسوپلاسما گوندی داشتند. با این حال نیاز به بررسی بیشتر این قبیل عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها باهم و نیز مطالعه ترکیبات تأثیر گذارشان ضروری بنظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی و حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دلیل همکاری‌های فراوان تشکر می‌شود. نتایج این مقاله حاصل از تصویب پروپوزال پژوهشی در دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با شماره IR.UMSU.REC.1399.007 می‌باشد. تعارض منافع بین نویسندگان و مجله مطالعات علوم پزشکی هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References:

1- Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97(4): 443-57.

2- Yazar S, Yaman O, Eser B, Altuntaş F, Kurnaz F, Şahin I. Investigation of Aniti-Toxoplasma gondii antibodies in patients with neoplasia. Journal of medical microbiology 2004; 53(12),1183-6.

3- Mostafavi SN, Jalali Monfared L. Toxoplasmosis epidemiology in Iran: a systematic review. J Isfahan Med Sch 2012; 30: 1-15.

4- Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev 2012; 25(2): 264-96.

5- Dubey J. Toxoplasmosis_a waterborne zoonosis. Vet Parasitol 2004; 126(1): 57-72.

6- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363:1965-76.

7- Petersen E. Toxoplasmosis. Semin Fetal Neonatal Med 2007; 12: 214-23.

8- Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB, Kruidering-Hall M. Pharmacology examination and board review. 10th Ed. New York: Mc Graw Hill; 2013. P: 451-9.

9- Zargari A. Medicinal plants, Tehran University publications. Volume 3. 1997, p: 894.

10- Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends Food Sci Tech 2011;22: 315-26.

11- Eisenberg DM. Trends in alter medicine use in the United States: results of a follow-up national survey. JAMA 1998;280:1569-75.

12- Abbasin et al. Evaluation of the antimicrobial effect of Scrophularia spp. On Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa and comparison with selective antibodies. Pharmaceutical Journal 2005; Sixth Year - Special Issue 1. (Persian).

13- Barsanti L, et al. biochemistry and biotechnology. New York: Taylor and Francis Group, 2006.

14- Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. Food Chem 2007; 103: 891-9.

15- Zhuang C, Itoh H, Mizuno T, Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed Umitoranoo. Bios Biotech Biochem 1995;59: 563–7.

16- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. Bioresource Technol 2005; 96: 1613-23.

17- Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, Araki Y. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. J Food Com Anal 2005; 18: 625-33.

18- Blanc N, Hauchard D, Audibert L, Gall EA. Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed Ascophyllum nodosum. An electrochem app 2011; 84: 513-8.

19- Mary JS, Vinotha P, Pradeep AM. Screening for in vitro Cytotoxic Activity of Seaweed, Sargassum sp.

Against Hep-2 and MCF-7 Cancer Cell Line. Asian Pacific J Cancer Prev 2012; 13 (12): 6073-6

20- Mohebali M, Rezayat MM, Gilani K, Sarkar S, Akhoundi B, Esmaeili J,et al. Nanosilver in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major (MRHO/IR/75/ER): an in vitro and in vivo study. DARU: J Pharm Sci 2009; 17(4): 285-9. (Persian).

21- Langer R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. Acc Chem Res 2000; 33(2): 94-101.

22- Miller CB, Waller EK, Klingemann HG, Dignani MC, Anaissie EJ, Cagnoni PJ, et al. Lipid formulations of amphotericin B preserve and stabilize renal function in HSCT recipients. Bone Marrow Transplant 2004; 33(5): 543-8.

23- Jones JL, Hanson DL, Dworkin MS, Alderton DL, Fleming PL, Kaplan JE, et al. Surviellance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992-1997. Arch Dermatol 1999; 135(8):897-902.

24- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. Toxoplasma gondii: from animals to humans. Int J Parasitol 2000; 30(12-13):1217-58.

25- Mitchell SM, Zajac AM, Davis WL, Lindsay DS. Efficacy of ponazuril in vitro and in preventing and treating Toxoplasma gondii infections in mice. J Parasitol 2004;90(3): 639-42.

26- Schmidt GD, Roberts LS, Janovy J. Fundations of Parasitology. 7th Ed McGraw-Hill. U.S.; 2005. P.702.

27- Gupta S. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends Food Sci Technol 2011; 22(6):315-26.

28. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ.Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seawweds. Bioresour technol. 2005; 96(14): 161323.

29- Rechinger H. Flora Ironical, Labiatae, Dracocephalum in flora ironical. Austria: Akademische Druckund Verlagsanstalt., 1986, 150; 218-230.

30- Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran: Farhange Moaser; 1996. P.192-3.

31- Jones-Brando L, D'Angelo J, Posner GH, Yolken R. In vitro inhibition of Toxoplasma gondii by four new derivatives of artemisinin. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 4206 - 8.

32- Kavitha N, Noordin R, Chan KL, Sasidharan S. In vitro anti-Toxoplasma gondii activity of root extract/fractions of Eurycoma longifolia Jack. BMC Complement Altern Med 2012; 12(1): 91.

33- Kamali M, Khosroyar S, Mohammadi A. Antibacterial activity of various extracts from Dracocephalum kotschyi against food pathogenic microorganisms. lnternational journal of pharm Tech 2015; 8(9): 158-63.

34- Gaafar MR, Mady RF, Diab RG, Shalaby TI. Chitosan and silver nanoparticles: Promising anti-toxoplasma agents. Exp Parasitol 2014; 143: 30-8.

35- Shagholani H, Ghorbani M, Nikpay A, Soltani M. Chitosan nanocapsule-mounted cellulose nanofibrils as nanoships for smart drug delivery systems and treatment of avian trichomoniasis. J Taiwan Inst Chem Eng 2019;95:290-9.

36- Mousavi SA, Ghotaslou R, Kordi S, Khoramdel A, Aeenfar A, Kahjough ST, et al. Antibacterial and Antifungal Effects of Chitosan Nanoparticles on Tissue Conditioners of Complete Dentures. Int J Biol Macromol 2018;118:881-5.

37- Alburquenque C, Bucarey SA, Neira-Carrillo A, Urzúa B, Hermosilla G, Tapia CV. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of candida spp. Med Mycol 2010;48 (8):1018-23.

38- Hagras NA, Allam AF, Farag HF, Osman MM, Shalaby TI, Mogahed NM, et al. Successful Treatment of Acute Experimental Toxoplasmosis by

Toxoplasma gondii infection: A systematic review. Parasite Epidemiol Control 2020;11: e00189.

Spiramycin-Loaded Chitosan Nanoparticles. Exp Parasitol 2019;204:107717.

39- Cheraghipour K, Masoori L, Ezzatkhah F, Salimikia I, Amiri S, Makenali AS, et al. Effect of chitosan on

Original Article

CYTOTOXIC EFFECT OF CHITOSAN AND ETHANOLIC EXTRACT OF *DRACOCEPHALUM KOTSCHYI* ON *TOXOPLASMA GONDII* RH STRAIN IN VITRO

Sajjad Masoumifard[1], Arash Aminpour[2], Soheil Yousefzadeh Valende[3], Mohammad Fattahi[4]

Received: 17 July, 2020; Accepted: 22 November, 2020

Abstarc

***Background & Aims*:** Toxoplasmosis is one of the most common parasitic infections in humans and other warm-blooded animals. One of the major problems of toxoplasmosis is its therapeutic limitation. The main treatment for this infection is the synergistic combination of pyrimethamine and sulfadiazine, though pyrimethamine is contraindicated in pregnant women owing to its teratogenicity. Considering many side effects that this parasite poses to immunocompromised individuals and pregnant women, the production of anti-Toxoplasma drugs with high efficacy and low side effects is therefore the main objective of Toxoplasma research. The goal of this study was to evaluate the cytotoxic effects of chitosan and ethanolic extract of *Dracocephalum kotschyi* on *Toxoplasma gondii* tachyzoites in RH strains under in vitro condition.

***Materials & Methods*:** RH strains of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with the concentrations of 45, 90, and 135 mg / ml of Zarrin-Giah ethanolic extract and concentrations of 150, 300, and 600 mg / ml of chitosan, as well as components of these concentrations were evaluated. They were then compared with the positive control drug (pyrimethamine) and negative control at 24, 48, and 72 hours incubation periods, separately and also by Trypan blue staining and MTT. The lethality percentage of the extract and chitosan was assessed and compared with dead tachyzoites. All stages were evaluated by triple control.

***Results*:** Following 48-hour incubation using Trypan blue test, the concentrations of 135 mg / ml of *D. kotschyi*, 600 mg / ml of chitosan, and 90 extracts with 150 mg / ml of chitosan were examined. Concentrations of 500 mg / ml of control drug with lethality percentage were 50.9, 77.2, 88.3, and 95.2, and ELISA results of MTT test with ODs of 0.098, 0.087 0.064, and 0.048 showed acceptable results. After 72 hours, more than 80% of toxoplasma tachyzoites were destroyed.

***Conclusion*:** Our findings revealed that chitosan extract, especially its combination with *D. kotschyi* extract, showed more promising results relative to the positive control drug, pyrimethamine, and the negative control. Moreover, the cytotoxic effects were maximum when these two drugs were used simultaneously.

***Keywords*:** *Toxoplasma gondii*, Chitosan, Toxoplasmosis, *Dracocephalum kotschyi*, Tachyzoites

Address: Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
Tel:*+984432753373*
Email: *arashaminpour@gmail.com*

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(10): 801 ISSN: 2717-008X

[1] *Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[2] *Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Bachelor student of Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran*
[4] *Associated Professor in Horticulture Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran*