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

سودابه الله‌دین[1]، شهرام خادم وطن[2]، محمود هاشمی تبار[3]، البرز اسکندری[4*]

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 مگلومین 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 موردبررسی قرار گرفت. میزان جذب نوری به‌وسیله دستگاه الایزا ریدر در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و سپس نتایج به‌صورت IC_{50} بیان شده است.

نتایج: میزان IC_{50} عصاره بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، برای لیشمانیا ماژور ۱۹µ g/ml و برای لیشمانیا اینفانتوم ۱۲µ g/ml به دست آمد به‌طوری‌که میزان IC_{50} داروی کنترل گلوکانتیم برابر ۲۱/۸µg/ml و۱۰/۱۶ µg/ml به ترتیب برای لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم هست.

بحث و نتیجه‌گیری: اثربخشی این عصاره بر روی این‌گونه انگل تقریباً معادل گلوکانتیم می‌باشد و بنابراین دارای پتانسیل استفاده از آن به‌عنوان 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 جندی‌شاپور- دانشکده داروسازی- گروه شیمی دارویی، تلفن: ۰۹۱۶-۳۵۴۵۴۰۶

Email: alborz86pharmacist@gmail.com

مقدمه

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 ۹۰درصد موارد لیشمانیوز جلدی 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 مورداستفاده در درمان لیشمانیوز، ازجمله ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان (مثل گلوکانتیم)

[1] کارشناسی ارشد انگل شناسی، گروه پارازیتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

[2] استادیار انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[3] دانشیار جنین شناسی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

[4] دانشیار جنین شناسی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (نویسنده مسئول)

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 ازجمله آمفوتریسین B و داروی جدید میلتفوسین 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 به‌نحوی‌که 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 ازجمله 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 وعامل ضد انگلی معرفی شده است (۱۰،۹).

روش MTT اولین بار در سال ۱۹۸۳ برای مطالعات ایمنولوژیک 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 دی متیل 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 کیاهان 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 رنگ سنجی MTT و مقایسه آن‌ها با با داروی کنترل گلوکانتیم می‌باشد.

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 عصاره گیری 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 مگلومین آنتی‌مونات با نام تجارتی گلوکانتیم (Glucantime®) به‌عنوان کنترل استفاده شده است. این دارو یک آنتی‌موان ۵ ظرفیتی است. این دارو در دمای $^{\circ}C$ ۴ نگه داری 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 تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شده‌اند. ابتدا پروماستیگوت‌های انگل‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در محیط RPMI-1649 (Sigma) به همراه۱۰درصد FCS و Iu/ml ۱۰۰ پنی‌سیلین و µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین در دمای $^{\circ}C$ ۱± ۲۴ کشت داده شدند و پس از رسیدن پروماستیگوت‌ها به فاز لگاریتمی رشد تعداد آن‌ها به کمک لام هموسیتومتر به Cell / ml ^{۶} ۱۰× ۱ 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 Mosmannجهت 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 رنگ سنجی است کی طی آن نمک

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، به‌طوری‌که کاهش در مقدار MTT احیا شده نشان دهنده سمیت دارو برای انگل می‌باشد. برای تهیه محلول استوک MTT، ۵ mg از پودر زرد رنگ MTT (خریداری شده از شرکت Sigma) در یک میلی لیتر PBS حل و در C ° ۲۰- نگهداری شد. محلول کار به طور تازه با مخلوط کردن یک حجم از محلول استوک MTT با ۹ حجم محیط کشت RPMI دارای ٪ ۵/۲ FCS تهیه و استفاده شد به‌طوری‌که غلظت نهایی MTT به ml / mg ۵/۰ می‌رسید (۱۳- ۱۵).

اضافه کردن پروماستیگوت‌ها، دارو و عصاره چای سبز:

۱۰۰µl از سوسپانسیون‌های انگل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم که حاوی $۱x ۱۰^{۶}$ سلول انگلی در هر میلی لیتر که در فاز لگاریتمی رشد هستند را به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه ای استریل به‌صورت سه بار تکرار (Triplicate) اضافه گردید به‌طوری‌که در هر چاهک میزان $۱×۱۰^{۵}$ 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 گلوکتیم را تهیه و به میزان ۱۰µl از آن را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای به‌صورت تریپلیکیت اضافه گردید. علاوه بر این از شاهد (بلانک) که حاوی فقط ۱۰۰µl 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 میکروپلیت ها را در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط انکوباسیون قرار گرفتند. بعد اتمام زمان انکوباسیون، میکروپلیت ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰RPM سانتریفوژ کرده و محلول رویی را جدا و به باقیمانده ۲۰µl از محلول MTT کار به هر چاهک اضافه شد. چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰µl محیط کشت و فقط ۲۰µl از محلول MTT می‌باشد. متعاقباً بعد از ۴-۳ ساعت انکوباسیون و سانتریفوژ کردن آن محلول رویی را جدا و کریستال‌های فورمازان را با اضافه کردن ۱۰۰µl 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 طول‌موج ۵۷۰nm (فیلتر رفرنس ۶۳۰nm) قرائت شد. سپس میزان IC_{50} (Inhibitory concentration %50) یعنی غلظتی که ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌ها را مهار می‌کند، محاسبه گردید (۱۳ و ۱۶).

بررسی تغییرات مورفولوژیک:

برای مشاهده تغییرات مورفولوژیک تیمار شده یا تیمار نشده با IC_{50} عصاره چای سبز، ابتدا پروماستیگوت‌ها در دور پایین ۱۰۰۰g و برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس ماده رویی دور ریخته شد و باقیمانده آن در محلول PBS به‌صورت سوسپانسیون درآمدند سپس سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و در بزرگنمایی ۱۰۰ × و در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴،۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری:

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

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

به‌طوری‌که 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 به‌صورت IC_{50} به‌وسیله رگرسیون خطی با استفاده از نرم افزار EXEL محاسبه گردید. جذب نوری به دست آمده به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده و فعال مرتبط است (۱۴،۱۳).

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 ۸۵ µg/ml، ۳۳/۵ µg/ml و ۱۹ µg/ml، ۸۰/۴۵ µg/ml، ۲۹/۵ µg/ml و ۱۲µg/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

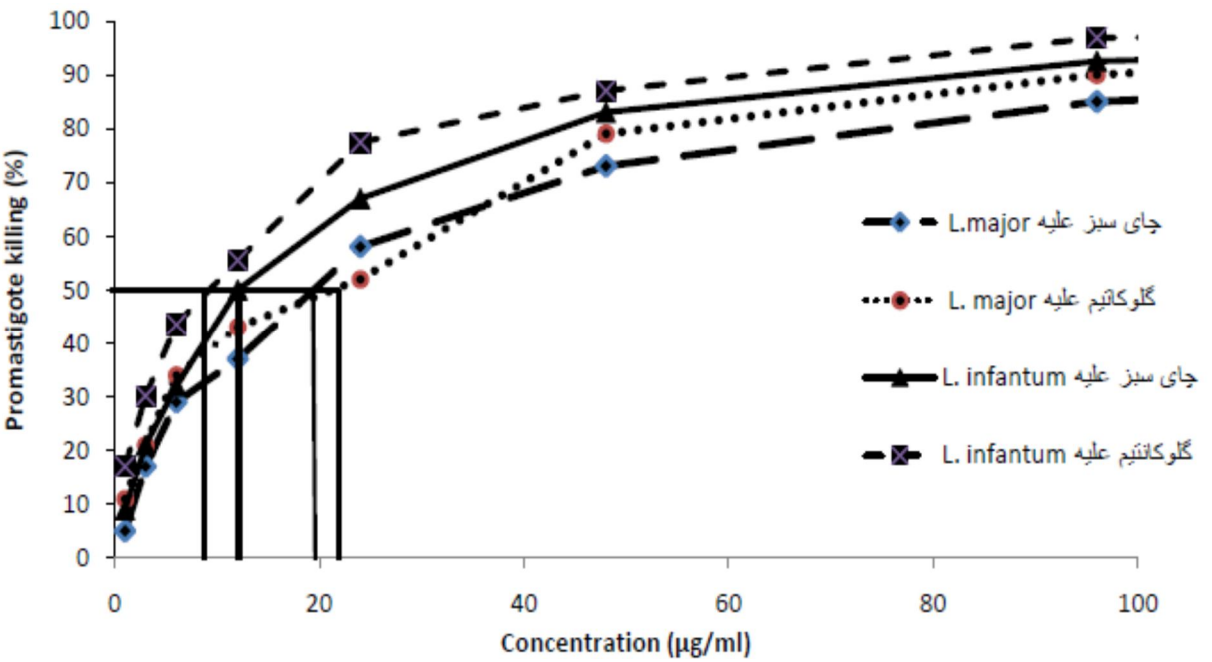
می‌باشد. به همین ترتیب IC_{50} های گلوکانتیم برای این دو گونه لیشمانیا در این جداول نشان داده است. درصد مرگ پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چای سبز و داروی گلوکانتیم بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در شکل ۱ نمایش داده شده است. در این شکل میزان IC_{50} عصاره گیاه چای سبز و داروی گلوکانتیم نشان داده شده است. با توجه به این شکل پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم حساسیت بیشتری را در مقایسه با لیشمانیا ماژور به عصاره گیاه چای سبز و داروی گلوکانتیم از خود نشان داده‌اند.

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

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

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

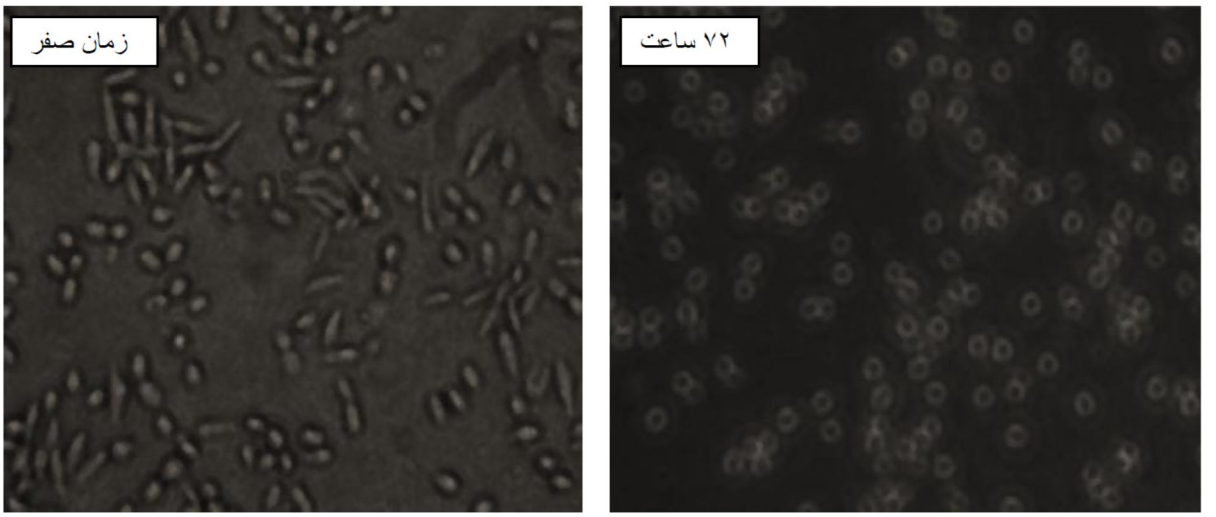
نام ترکیب	IC_{50} (µg/ml)		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
عصاره گیاه چای سبز	۸۰/۴۵	۲۹/۵	۱۲
گلوکانتیم	۷۵/۵	۲۵	۱۰/۱۶



شکل (۱): درصد مرگ پروماستیگوت‌های 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.

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌ها:

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور مواجهه شده با غلظت ۱۹µ g/ml (IC_{50}) عصاره چای سبز بررسی شد که پس از ۸ ساعت مواجهه شدن با عصاره تغییرات بروز کرده و و در پایان ۷۲ ساعت تمام سلول‌ها شروع به چروکیدن (Cell shrinkage)، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم (Cytoplasmic condensation) و کوچک ترشدن کردند. هیچ گونه تغییری در پروماستیگوت‌های کنترل مشاهده نشد (شکل ۲).



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

بحث و نتیجه‌گیری

لیشمانیوز مجمو عه ای از بیماری‌های انگلی است که به‌صورت طیف وسیعی از تظاهرات بالینی نظیر لیشمانیوز پوستی، پوستی-مخاطی و احشایی ایجاد می‌شود. اپیدمیولوژی و نشانه‌های بیماری به دلیل وجود فاکتورهای متعدد انگل، میزبان و محیط بسیار متغییر است. انگل لیشمانیا در مناطق مختلف ایران به‌صورت 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 بیماری لیشمانیوز می‌باشد. به دلیل کاهش تأثیر داروهای خط اول در درمان لیشمانیوز (مثل ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان) 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، کاتشین ها (catechin) هستند که این‌ها خود از زیرگروه پلی فنل ها هستند که دارای خواص ضدالتهابی، ضدموتاژنی و آنتی‌اکسیدانتی در سیستم‌های مختلف بیولوژیک هستند. EGCG مهم‌ترین و فراوان‌ترین کاتشین است که این ترکیب با اثر برروی بیان تنظیم کننده‌های چرخه سلولی، باعث توقف چرخه سلولی والقای آپوپتوزیس می‌شود (۶- ۱۰ و ۱۸). پیش‌تر ازاین از چای سبز برای کنترل بیماری‌هایی چون پارکینسون، آلزایمر، آلرژی و سرطان استفاده شده بود که این خواص بخاطر وجود ترکیبات پلی فنلیک آن است (۷- ۹). اخیراً فیلی همکاران مکانیسم‌های احتمالی فعالیت ضد لیشمانیایی 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 لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم به کمک روش رنگ سنجی MTT بررسی شد. با بررسی نتایج دو سویه این نتیجه به دست آمد که پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم نسبت به پروماستیگوت‌های لیشمانیا 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 لیشمانیا ماژور نسبت گلوکانتیم بیشتر است درحالی که نتایج به دست آمده درمورد لیشمانیا اینفانتوم برعکس می‌باشد. با توجه به اینکه عصاره گیاه چای سبز

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 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 الله دین می‌باشد، تشکر و قدر دانی می‌گردد.

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.

Original Article

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

*Sudabeh Allahdin[1], Shahram Khademvatan[2], Mahmoud Hashemitabar[3], 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 c*amellia 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 ($1x10^6$ 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 IC_{50} of 19 µg/ml for *L.major* promastigotes whereas for *L.infantum* with IC50 of 12µg/ml after 72 h of incubation. Glucantime had IC_{50}s 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 capablity 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 Jundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran (Corresponding Author)*