DOI: 10.22122/jims.v36i511.10896 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۵۱۱/هفته‌ی سوم اسفند ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵

ارزیابی تأثیر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی هیدروالکلی قارچ گانودرما لوسیدوم بر انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

سکینه اکبری[۱]، جواهر چعباوی‌زاده[۲]، سیدمحمد ابطحی[۲]، افسانه یگدانه[۳]، فاطمه نامدار[۴]، صدیقه صابری[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لیشمانیا ماژور، عامل لیشمانیوز نوع جلدی (سالک) در ایران می‌باشد. به دلیل عوارض جانبی داروهای فعلی و پیدایش مقاومت دارویی در برخی نقاط، محققین به دنبال ترکیباتی مؤثرتر و بدون عوارض به خصوص داروهای گیاهی و ترکیبات طبیعی هستند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی هیدروالکلی قارچ گانودرما لوسیدوم بر لیشمانیا ماژور در مقایسه با داروهای رایج بوده است.

روش‌ها: پس از آماده شدن عصاره‌ی هیدروالکلی گونه‌ی استاندارد ایرانی انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER)، ابتدا در محیط کشت Novy-Mac Neal-Nicolle (NNN) و سپس، Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) غنی شده تکثیر و در مرحله‌ی متاسیکلیک به پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. سپس، غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثردهی و میزان پروماستیگوت‌های زنده با استفاده از رنگ تریپان بلو و تحرک آن‌ها، هموسیتومتر و آزمون رنگ‌سنجی MTT مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA، Repeated measures ANOVA و Kolmogorov-Smirnov تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: عصاره‌ی هیدروالکلی این قارچ در غلظت‌های بالا (۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری باعث کاهش و مهار رشد انگل شد و با افزایش عامل زمان رابطه‌ی مستقیم داشت ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین، در روش MTT میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری با هم داشته است ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: تأثیر ضد لیشمانیایی مشاهده شده از عصاره‌ی این قارچ بر تعداد و رشد پروماستیگوت‌های زنده در غلظت‌های بالا، می‌تواند ناشی از وجود ترکیباتی مانند تانن، فلاونوئیدها، تری‌ترپنوئیدها و پلی‌ساکاریدها باشد و مستلزم تحقیقات بیشتر در خصوص خالص‌سازی ترکیبات آن و کار بر روی مدل حیوانی لیشمانیوز می‌باشد.

واژگان کلیدی: لیشمانیوز جلدی، لیشمانیا ماژور، قارچ گانودرما لوسیدوم

ارجاع: اکبری سکینه، چعباوی‌زاده جواهر، ابطحی سیدمحمد، یگدانه افسانه، نامدار فاطمه، صابری صدیقه. **ارزیابی تأثیر ضد لیشمانیایی عصاره‌ی هیدروالکلی قارچ گانودرما لوسیدوم بر انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۵۱۱): ۱۶۳۴-۱۶۲۸

مقدمه

لیشمانیوز جلدی روستایی، یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان (Zoonoses) است و در بیشتر نقاط دنیا از جمله ایران شایع می‌باشد (۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالانه ۱۲ میلیون نفر مبتلا و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به این بیماری قرار دارند و سالیانه ۲ میلیون مورد جدید گرفتار می‌شوند (۲). در کشور ایران، تعداد افرادی که به لیشمانیوز جلدی مبتلا می‌شوند، به طور متوسط ۲۸ نفر در هر ۱۰۰۰ نفر جمعیت می‌باشد و سالانه ۲۰/۰۰۰ مورد ابتلای جدید در اغلب نقاط ایران گزارش می‌شود (۳). با توجه به افزایش موارد لیشمانیوز جلدی در ایران و همچنین، به دلیل پیدایش مقاومت دارویی علیه داروهای استاندارد که بیشتر ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان می‌باشند، درمان لیشمانیوز جلدی با مشکلات فراوانی همراه شده است

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: صدیقه صابری

Email: sedisaberi@yahoo.com

و گزارش‌هایی از مراکز درمانی و پزشکان معالج مبنی بر عود، عدم بهبودی و مؤثر نبودن داروها در بیماران وجود دارد (۴).

در مطالعه‌ای در آمریکای لاتین نشان داده شد که با وجود مراقبت‌های ویژه و درمان با سدیم استیبوگلوکانات (پنتوستام) میزان عود بیماری ۲۵ درصد می‌باشد (۵). در بیشتر نقاط جهان، ترکیبات مگلومین آنتی‌مونات (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونات به عنوان داروهای انتخابی خط اول درمان مصرف می‌شوند، اما طی چند سال اخیر، میزان اثربخشی این داروها به میزان ۵۰-۲۰ درصد کاهش یافته است و در حال حاضر، مواردی مانند عدم بهبود بالینی، عود و عوارض جانبی ناشی از بعضی ترکیبات ساخته شده با کیفیت نامطلوب از مشکلات اصلی درمان این بیماری محسوب می‌شود.

همچنین، پیدایش سویه‌های مقاوم، منجر به گرایش به استفاده از داروهای شیمیایی دیگر مانند میلتفوسین، آمفوتریسین B، کتوکونازول، پارومومایسین و سایر داروها شده است که اثرات جانبی و سمیت از جمله نقایص این داروها به حساب می‌آید. از طرفی، این درمان‌ها به علت هزینه‌ی بالا و عدم دسترسی به آن‌ها در مناطق روستایی مناسب نیستند (۶-۵). در بسیاری از کشورهای در حال پیشرفت، مردم به دلیل قابل دسترس‌تر و ارزان‌تر بودن گیاهان دارویی، توجه خاصی به استفاده از آن‌ها دارند. بر اساس گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی، حدود ۸۰ درصد مردم دنیا برای درمان بیماری‌های خود از گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها استفاده می‌کنند. استفاده از گیاهان دارویی هر منطقه با توجه به ترکیبات مؤثر آن‌ها، می‌تواند به عنوان منبع داروهای ضد لیشمانیایی به کار برده شود (۹-۶).

یکی از این رستنی‌ها، قارچ گانودرما لوسیدوم می‌باشد که در میسیلیوم، اندام بارده و اسپور آن دارای ۴۰۰ نوع ماده‌ی فعال بیولوژیکی است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ترپنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و بسیاری مواد نایاب دیگر اشاره کرد (۱۳-۱۰). همچنین، ملانین موجود در این قارچ، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، تقویت سیستم ایمنی، محافظت در برابر اشعه و ضد جهش می‌باشد (۱۴). در این مطالعه، تأثیر عصاره‌ی هیدروالکلی این قارچ بر انگل لیشمانیا ماژور در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

تهیه‌ی عصاره‌ی قارچ: این مطالعه به صورت تجربی در دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ انجام گردید. به منظور تهیه‌ی عصاره‌ی قارچ گانودرما لوسیدوم، ابتدا این قارچ از شرکت SABZE BANDPA خریداری گردید و با استفاده از روش Maceration عصاره‌گیری شد. در ابتدا، ۱۲۵ گرم قارچ مورد نظر توسط آسیاب الکتریکی به صورت پودر در آمد و با ۱۰۰۰ سی‌سی الکل اتانول ۹۶ درصد به عنوان حلال در ظرف شیشه‌ای بزرگ مخلوط گردید و هر چند ساعت یک بار مخلوط به هم زده شد و روی Shaker قرار گرفت تا مواد مؤثره‌ی آن بهتر خارج شود. پس از گذشت ۴۸ ساعت، با استفاده از کاغذ صافی واتمن، قیف بوخنر و ایجاد خلأ عصاره‌گیری شد و الکل آن توسط دستگاه روتاری در خلأ تقطیر، تغلیظ و گرفته شد و برای استفاده در مراحل بعدی آماده گردید.

تهیه و کشت پروماستیگوت: برای این منظور، از پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا سویه‌ی استاندارد ایرانی (MRHO/IR/75/ER) موجود در گروه قارچ و انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان استفاده شد. ابتدا، در محیط کشت دو قسمتی Novy-Mac Neal-Nicolle (NNN) کشت انجام شد. به عنوان قسمت مایع، از ۰/۲ میلی‌لیتر Brain heart infusion (BHI) ۴ درصد و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر محیط استفاده شد. سپس، در محیط Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) غنی شده با ۱۰ درصد Fetal calf serum (FCS) یا Fetal bovine serum (FBS) کشت داده و به حجم انبوه رسانده شد.

اثردهی عصاره بر فرم پروماستیگوت: غلظتی از انگل به میزان ۵×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر آن حاوی ۵×۱۰^{۵} انگل متاسیکلیک به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. سپس، پنج غلظت ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره‌ی گانودرما تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر آن به هر چاهک اضافه شد و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد انگل‌های زنده‌ی متحرک و با استفاده از رنگ حیاتی تریپان بلو شمارش شدند. این مراحل دو بار تکرار شد. جهت شاهد منفی در هر پلیت دو چاهک دارای پروماستیگوت و فاقد عصاره در نظر گرفته شد. داروی گلوکانتیم به عنوان شاهد مثبت و داروی رایج و مورد استفاده در کلینیک به میزان ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و همچنین، آمفوتریسین B (۰/۶ میکروگرم/میلی‌لیتر) نیز به عنوان داروی مؤثر بر فرم پروماستیگوت در نظر گرفته شد. همچنین، دو چاهک نیز برای Dimethyl sulfoxide (DMSO) ۲ درصد به عنوان حلال عصاره‌ی تغلیظ شده در نظر گرفته شد (۱۵). نمونه‌ها به روش شمارش مستقیم و با استفاده از لام هموسیتومتر (نئوبار) و بر اساس فرمول زیر شمارش شدند و به مدت سه روز مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵).

۱۰۰۰۰ × ۲۵ × ضریب رقت × میانگین تعداد انگل در ۵ خانه‌ی شمارش Red blood cell (RBC) در لام نئوبار = میانگین تعداد انگل در هر سی‌سی محیط کشت

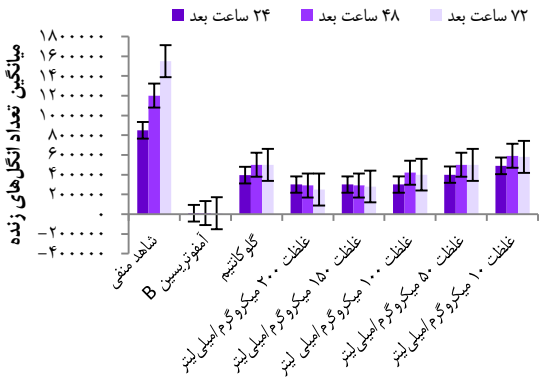
روش MTT: در این روش، میزان زنده بودن پروماستیگوت‌ها با استفاده از آزمون کمی رنگ‌سنجی مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا برای تهیه‌ی محلول مادر (Stock) 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT)، پودر زردرنگ MTT (SIGMA) در یک میلی‌لیتر Phosphate buffered saline (PBS) حل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. محلول کار روزانه و به طور تازه با مخلوط کردن یک حجم از محلول مادر MTT و ۹ حجم محیط کشت RPMI- 1640 دارای FBS ۵ درصد تهیه واستفاده شد؛ به طوری که غلظت نهایی MTT، ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود (۱۶-۱۵). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور قسمت ایستایی حاوی ۵×۱۰^{۵} انگل به هر کدام از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای استریل اضافه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی قارچ در ۵ غلظت (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) به هر یک از چاهک‌های حاوی انگل اضافه شد.

برای هر غلظت، دو چاهک در نظر گرفته شد. چاهک‌های شاهد مثبت شامل گلوکانتیم و همچنین، آمفوتریسین B (با غلظت‌های پیش‌گفته) و شاهد منفی فقط حاوی پروماستیگوت‌های انگل بود. همچنین، برای DMSO که حلال بود، دو چاهک حاوی پروماستیگوت و برای گروه بلانک نیز دو چاهک فقط حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 فاقد پروماستیگوت و دارو در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم پودر MTT در ۱ میلی‌لیتر محلول PBS) به هر چاهک اضافه گردید. پلیت‌ها در فویل آلومینیومی پوشیده شد و به مدت ۴-۳ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. سپس، پلیت‌ها از انکوباسیون بیرون آورده شدند و جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان، به هر چاهک حجمی معادل محیط کشت اولیه یعنی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO افزوده شد و با سمپلر به آرامی مخلوط گردید تا محیط یکدست شده و دانه‌های رسوبی حل شوند و بار دیگر به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. سپس، جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه خوانشگر Enzyme linked immunosorbent assay reader (ELISA Reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. تعداد نسبی سلول‌های زنده، ارتباط مستقیمی با میزان جذب نوری نمونه دارد (۱۷-۱۶). تمامی این مراحل، در سه دوره‌ی کامل تکرار گردید.

نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA، Repeated measures ANOVA و Kolmogorov-Smirnov تجزیه و تحلیل گردید. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثردهی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی قارچ گانودرما لوسیدوم بر پروماستیگوت‌های زنده و درصد زنده ماندن آن‌ها در شکل ۱ آمده است. بیشترین درصد انگل‌های زنده به ترتیب مربوط به گروه‌های شاهد، DMSO، غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، گلوکانتیم، غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر می‌باشد و کمترین درصد انگل‌های زنده، مربوط به گروه آمفوتریسین B، غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر است. آزمون آماری ANOVA نشان داد با افزایش غلظت، میزان کشندگی افزایش می‌یابد. به عبارتی، افزایش غلظت با کاهش تعداد انگل زنده در محیط کشت همراه بوده است ($P < ۰/۰۰۱$). به علاوه، با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov جهت بررسی تأثیر عامل زمان بر تعداد انگل‌های زنده، مشخص شد که در ۲۴ ساعت اول، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد ($P = ۰/۰۸۵$)، اما پس از ۴۸ ساعت، این تأثیر برای غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نسبت به گلوکانتیم، شاهد منفی، DMSO و غلظت ۱۰ میکرگرم/میلی‌لیتر مؤثر و معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$).



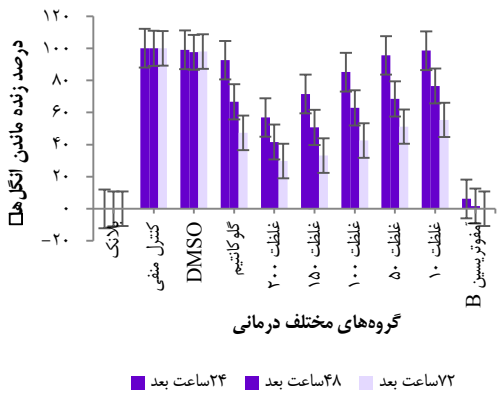
شکل ۱. تغییرات میانگین انگل زنده‌ی کشت شده بر اساس غلظت‌های مختلف عصاره (میکروگرم/میلی‌لیتر) به تفکیک زمان

میانگین مقادیر انگل کشت شده در زمان‌های ۲۴، ۲۸ و ۷۲ ساعت پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره در مقایسه با داروی گلوکانتیم نشان می‌دهد عصاره در غلظت‌های بالا و با گذشت زمان تأثیر بهتری نسبت به داروی گلوکانتیم داشته است. این تأثیر در گروه‌های غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و به مقدار کمتر درگروه غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر قابل مشاهده می‌باشد.

از طرفی، آمفوتریسین B با خاصیت کشندگی زیاد و درصد بسیار کم انگل زنده نسبت به غلظت‌های متفاوت عصاره ارتباط معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۱$). غلظت ۱۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر

عصاره با گلوکانتیم ارتباط معنی‌داری نداشت، اما با شاهد منفی، DMSO و غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر ارتباط معنی‌داری داشت. غلظت‌های ۱۰، ۵ و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر نیز اگر چه با روند کاهش پروماستیگوت زنده همراه بودند، اما با یکدیگر ارتباط معنی‌داری نداشتند. در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت بین غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر با هر یک از موارد گلوکانتیم، آمفوتریسین B، شاهد، DMSO و غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P = ۰/۰۴۹$).

نتایج حاصل از روش MTT و آزمون ANOVA برای جذب نوری در غلظت‌های مورد بررسی عصاره‌ی هیدروالکلی قارچ گانودرما بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بر روی رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور که در شکل ۲ آمده است، نشان می‌دهد میانگین جذب نوری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های مختلف عصاره داشته است؛ به طوری که غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر کمترین مقدار و غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بیشترین میزان جذب نوری را در میان غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌ی هیدروالکلی قارچ گانودرما لوسیدوم داشته است. در این شکل، بیشترین میانگین جذب نوری پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب مربوط به گروه شاهد منفی، DMSO، غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و گلوکانتیم می‌باشد و کمترین آن‌ها مربوط به گروه بلانک، آمفوتریسین B و سپس غلظت‌های ۲۰۰، ۱۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره‌ی قارچ می‌باشد.



شکل ۲. درصد زنده ماندن انگل‌ها در روش MTT به تفکیک زمان و گروه مورد بررسی

بحث

ایران یکی از مناطق اندمیک بیماری لیشمانیوز نوع جلدی روستایی است (۱۸). در حال حاضر، داروهای انتخابی برای لیشمانیوز جلدی ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان هستند(۱۹). تحقیقات نشان داده است که این داروها، دارای معایبی نظیر سمیت، اثرات جانبی، میزان عود، هزینه‌ی بالا، طول دوره‌ی درمان و مقاومتی است که به تازگی انگل به این داروها نشان داده است. این معایب، محققین را بر آن داشته است تا مطالعات بیشتری برای ساخت داروهای جدید مؤثر و کم عارضه انجام دهند (۲۰). از آن جایی که که داروهای گیاهی ممکن است دارای عوارض جانبی کمتر و همچنین، قابلیت دسترسی بیشتر و هزینه‌ی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی باشند، شاید بتوان گفت استفاده از گیاهان بومی هر منطقه، می‌تواند با توجه به ترکیبات مؤثره‌ی آن‌ها به عنوان منبعی از عوامل دارویی از جمله ضد لیشمانیا محسوب شود (۶).

یکی از این رستنی‌ها، قارچ گانودرما لوسیدوم است که تحقیقات زیادی به خواص دارویی آن مانند خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد حساسیت، تقویت سیستم ایمنی، ضد تومور، کاهش قند و فشار خون و غیره اشاره دارد (۲۱). همچنین، مطالعات متعددی خاصیت ایمونومدولاتوری عصاره‌ی هیدروالکلی این قارچ را مطرح کرده‌اند که این خاصیت را مرتبط با وجود ترکیباتی نظیر پلی‌ساکاریدها (به خصوص β-d گلوکان‌ها)، پروتئین‌ها (به ویژه Ling zhi 8) و تری‌ترپنوئیدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، پپتیدها، ملانین و فلاونوئیدهای یافته شده در آن می‌دانند (۲۲، ۱۳).

به نظر می‌رسد این ترکیبات، به خصوص پلی‌ساکاریدها، تری‌ترپنوئیدها و فلاونوئیدها، می‌توانند دارای اثرات ضد لیشمانیایی باشند (۲۳). بر همین اساس، این مطالعه طراحی گردید تا تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی الکلی قارچ گانودرما لوسیدوم بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهد.

نتایج حاصل از این مطالعه، چه در روش شمارش مستقیم با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ و چه با روش رنگ‌سنجی MTT نشان داد که تأثیر عصاره وابسته به میزان غلظت آن بوده است؛ به طوری که با افزایش غلظت عصاره، اثر مهاری بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در مقایسه با داروی گلوکانتیم افزایش یافته است و کاهش جذب نوری در غلظت‌های بالا، نشان دهنده‌ی این اثر مهاری می‌باشد. این کاهش در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در مقایسه با داروی گلوکانتیم دارای اختلاف معنی‌داری بوده است ($P < ۰/۰۵۰$). این نتیجه، در راستای بسیاری از مطالعات انجام شده بر عصاره‌های گیاهان به ویژه بر روی فرم پروماستیگوت انگل است. به عنوان مثال، Castillo و همکاران در منطقه‌ی Dios پرو، عصاره‌های هفت گیاه دارویی را علیه فرم‌های

Exonic پروماستیگوت و اماستیگوت Leishmania amazonensis به صورت In vitro مورد آزمایش قرار دادند که از بین آن‌ها، عصاره‌ی اتانولی ساقه‌ی گیاه Himatanthus sucuuba فعالیت ضد لیشمانیایی قابل توجهی را نشان داد که خواص آن وابسته به دز عصاره و مربوط به ترکیباتی مانند Plumericin و Isoplumericin شناخته شد (۲۳).

همچنین، نتایج مطالعه‌ی حاضر از نظر تأثیر مستقیم و معنی‌دار مقدار غلظت و مدت زمان اثردهی عصاره، در راستای مطالعاتی مانند مطالعه‌ی Zhang و Lin می‌باشد که خاصیت کاهش قند خون عصاره‌ی قارچ گانودرما لوسیدوم بر روی موش‌های ناشتا را بررسی نمودند و میزان تأثیر عصاره را وابسته به دز و زمان اثردهی عصاره دانستند؛ به طوری که مشخص شد دز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی پلی‌ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم یک ساعت پس از تجویز، می‌تواند سطح انسولین موجود در گردش خون موش‌ها را افزایش و سطح گلوکز سرمی را ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی به طور معنی‌داری کاهش دهد. دز ۵۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم از عصاره‌ی قارچ گانودرما لوسیدوم هنگامی که به صورت خوراکی مصرف می‌شود، اثر بهتری بر جای می‌گذارد (۲۴). اگر چه مطالعات نشان داده است عصاره روی سنتز انسولین اثری ندارد، اما می‌تواند باعث آزاد شدن آن از سلول‌های جزیره‌ای گردد (۲۵-۲۴).

از طرف دیگر، چنانچه گفته شد، قارچ گانودرما لوسیدوم حاوی ترکیبات بیولوژیکی مؤثری مانند تری‌ترپنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و بسیاری مواد نایاب دیگر می‌باشد و اثر مهار کنندگی عصاره‌ی آن در مطالعات متعددی بررسی شده است. Sivaprakasam و همکاران، تأثیر بازدارندگی عصاره‌ی قارچ گانودرما لوسیدوم بر رشد باکتری‌هایی نظیر Escherichia coli، Pseudomonas aeruginosa، Salmonella Typhi، Salmonella typhi و همچنین، قارچ‌هایی مانند Penicillium، Aspergillus niger، Aspergillus fumigatus و Mucor نسبت به عصاره‌ی متانولی آن را بررسی و اثبات کرده است که عصاره‌ی اتانولی قارچ گانودرما لوسیدوم توانایی بازدارندگی بهتری نسبت به عصاره‌ی متانولی آن دارد (۲۶).

Wadt و همکاران، تأثیر ضد التهابی و ضد میکروبی عصاره‌ی اتانولی و آبی قارچ گانودرما لوسیدوم بر علیه گونه‌ی Staphylococcus aureus و Candida albicans را بر روی Ratهای نژاد Wistar بررسی و مشاهده کردند که عصاره‌ی هیدروالکلی این قارچ می‌تواند ۸۵-۷۰ درصد از رشد آن‌ها جلوگیری کند. مطالعه‌ی Wadt و همکاران و بسیاری از مطالعات مشابه به این نکته اشاره دارند که علت اصلی خواص ضد التهابی و ضد میکروبی قارچ گانودرما لوسیدوم می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات فنلیک مانند تانن و فلاونوئیدها و همچنین، تریپن‌ها باشد که قادرند به عنوان مهار کننده‌ی عناصر فلزی در مسیرهای متابولیکی باکتری‌ها و قارچ‌ها تداخل ایجاد کنند (۲۷).

به همین دلیل، خاصیت ضد لیشمانیایی مورد مشاهده در این تحقیق را به ویژه در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر که توانسته است حدود نیمی از انگل‌های زنده را از بین ببرد، می‌توان ناشی از حضور این ترکیبات و تأثیر آن‌ها بر فرم پروماستیگوت انگل دانست. همچنین، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد تأثیر مهار کنندگی عصاره‌ی این قارچ در مقایسه با آمفوتریسین B معنی‌دار نبوده است، اما تأثیر غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آن در مقایسه با داروی گلوکانتیم معنی‌دار بوده است. در حال حاضر، داروی رایج در بالین و خط اول درمان در کشور ما، ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان مانند گلوکانتیم است و آمفوتریسین B با توجه به سمیت و گران بودن آن در اولویت بعدی درمان بوده است و هدف از استفاده از آن، به عنوان شاهد مثبت قوی بوده است، اما می‌توان ابراز داشت تأثیر معنی‌دار غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در مقایسه با داروی رایج گلوکانتیم به ویژه با توجه به نوع مصرف آن که تزریقی می‌باشد و عوارض ناشی از تعدد دفعات دردناک بودن محل تزریق به خصوص در ناحیه‌ی صورت نتیجه‌ی قابل توجهی است و می‌تواند قابلیت کاربرد عصاره‌ی این قارچ را به عنوان یک ترکیب موضعی مطرح نماید که مستلزم تحقیقات بیشتر در خصوص خالص‌سازی ترکیبات آن و کار بر روی مدل حیوانی لیشمانیوز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر، حاصل از طرح تحقیقاتی مصوب شماره‌ی ۳۹۶۵۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. از گروه فارماکوگنوزی دانشکده‌ی داروسازی و گروه قارچ و انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی این دانشگاه جهت همکاری و حمایت‌های صمیمانه‌ی آن‌ها سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of human and murine leishmaniasis. Int J Mol Sci 2017; 18(6): 1296.
2. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012; 7(5): e35671.
3. Shirzadi MR, Esfahania SB, Mohebalia M, Ershadia MR, Gharachorlo F, Razavia MR, et al. Epidemiological status of leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran, 1983-2012. East Mediterr Health J 2015; 21(10): 736-42.
4. Arana B, Rizzo N, Diaz A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: A review. Med Microbiol Immunol 2001; 190(1-2): 93-5.
5. Brito NC, Rabello A, Cota GF. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. PLoS One 2017; 12(9): e0184777.
6. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 2005; 12 (6-7): 514-35.
7. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. Phytochemistry 2005; 66(17): 2056-71.
8. Nilforoushzadeh MA, Shirani-Bidabadi L, Zolfaghari-Baghbaderani A, Saberi S, Siadat AH, Mahmoudi M. Comparison of Thymus vulgaris (Thyme), Achillea millefolium (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in balb/c mice. J Vector Borne Dis 2008; 45(4): 301-6.
9. Kermani EK, Sajjadi SE, Hejazi SH, Arjmand R, Saberi S, Eskandarian AA. Anti-leishmania activity of osthole. Pharmacognosy Res 2016; 8(Suppl 1): S1-S4.
10. Gao JJ, Min BS, Ahn EM, Nakamura N, Lee HK, Hattori M. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from Ganoderma lucidum and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2002; 50(6): 837-40.
11. Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R. Medicinal mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Glasgow, UK: University of Strathclyde and Cancer Research, UK: 2002.
12. McKenna DJ, Jones K, Hughes K, Humphrey S. Botanical medicines: The desk reference for major herbal supplements. 2nd ed. New York, NY: Haworth Herbal Press; 2002. p. 825-55.
13. Kim HW, Kim BK. Biomedicinal triterperoids of Ganoderma lucidum (Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). Int J Med Mushrooms 1999; 1: 121-38.
14. Badalyan SM, Gharibyan NG, Kocharyan AE. Perspectives in the Usage of Bioactive Substances of Medicinal Mushrooms in Pharmaceutical and Cosmetic Industries. Int J Med Mushrooms 2007; 9(3-4): 275-6.
15. Varshosaz J, Arbabi B, Pestehchian N, Saberi S, Delavari M. Chitosan-titanium dioxide-glucantime nanoassemblies effects on promastigote and amastigote of Leishmania major. Int J Biol Macromol 2018; 107(Pt A): 212-21.
16. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. Parasitol Int 2005; 54(2): 119-22.
17. Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. Res Microbiol 2004; 155(4): 224-30.
18. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27(5): 305-18.
19. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. Int J Infect Dis 2011; 15(8): e525-e532.
20. Saberi S, Arjmand R, Soleimanifard S, Khamesipour A, Hosseini SM, Salehi M, et al. In vivo/In vitro immune responses to L. major isolates from patients with no clinical response to Glucantime. Adv Biomed Res 2016; 5: 126.
21. Lindequist U, Niedermeyer TH, Julich WD. The pharmacological potential of mushrooms. Evid Based Complement Alternat Med 2005; 2(3): 285-99.
22. Tanaka S, Ko K, Kino K, Tsuchiya K, Yamashita A, Murasugi A, et al. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, Ganoderma lucidium, having similarity to immunoglobulin variable regions. J Biol Chem 1989; 264(28): 16372-7.
23. Castillo D, Arevalo J, Herrera F, Ruiz C, Rojas R, Rengifo E, et al. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with Himatanthus sucuuba (Apocynaceae). J Ethnopharmacol 2007; 112(2): 410-4.
24. Zhang HN, Lin ZB. Hypoglycemic effect of Ganoderma lucidum polysaccharides. Acta Pharmacol Sin 2004; 25(2): 191-5.
25. Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, Benzie IFF. Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Source Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor and Francis; 2011.
26. Sivaprakasam E, Balakumar R, Kavitha D. Evaluation Of Antibacterial And Antifungal Activity Of Ganoderma Lucidum (Curtis) P. Karst Fruit Bodies Extracts. World Journal of Science and Technology 2011; 1(6): 8-11.
27. Wadt N, Okamoto M, Hi E, Bach E. Chemical, toxicological, anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of ganoderma lucidum extracts. Emir J Food Agric 201; 27(7): 577-84.

DOI: *10.22122/jims.v36i511.10896* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 511, 3rd Week, March 2019**

Received: 08.10.2018 Accepted: 11.11.2018 Published: 06.03.2019

Evaluation of Antileishmanial Effect of Hydroalcoholic Extract of Ganoderma Leucidum on Leishmania Major in Vitro

Sakineh Akbari[1], Javaher Chabavizadeh[2], Seyed Mohammad Abtahi[2], Afsaneh Yegdaneh[3], Fatemeh Namdar[4], Sedigheh Saberi[2]

Original Article

Abstract

Background: Leishmania major is the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Iran. Because of the side effects of current drugs and the emergence of drug resistance in some areas, researchers have been seeking for more effective and non-complicated compounds, especially herbal medicines and natural compounds, for the treatment of leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate the antileishmanial effect of hydroalcoholic extract of Ganoderma leucidum on Leishmania major compared to commonly used drugs.

Methods: Iranian Leishmania major parasite species (MRHO/IR/75/ER) was cultured in Novy-Mac Neal-Nicolle (NNN) and Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI)-enriched media, and in the metacyclic phase transferred to a 96-well plate at the time of preparation of the hydroalcoholic extracts. Then, concentrations of 10, 50, 100, 150, and 200 µg/ml were used at 24, 48, and 72 hours. The amount of live promastigotes was assessed by using a hemocytometer and MTT colorimetric assay. Data were analyzed using Kolmogorov-Simonov, ANOVA, and repeated measures ANOVA tests, and $P < 0.05$ was considered as a meaningful level.

Findings: The hydroalcoholic extract of this mushroom at high concentrations (150 and 200 µg/ml) inhibited the growth of the parasite significantly, and had a direct correlation with the increase of time ($P < 0.001$). Moreover, in the MTT method, it was a significant difference in the mean of optical absorption of different extract concentrations at 24, 48, and 72 hours ($P < 0.001$).

Conclusion: The observed antileishmanial effect of Ganoderma leucidum extract on the number and growth of live promastigotes at high concentrations can be resulted due to its compounds such as tannins, flavonoids, triterophenides, and polysaccharides. It requires further research on the purification of its compounds and work on the animal model of Leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Cutaneous, Leishmania Major, Ganoderma lucidum

Citation: Akbari S, Chabavizadeh J, Abtahi SM, Yegdaneh A, Namdar F, Saberi S. **Evaluation of Antileishmanial Effect of Hydroalcoholic Extract of Ganoderma Leucidum on Leishmania Major in Vitro.** J Isfahan Med Sch 2019; 36(511): 1628-34.

1- MSc Student, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD Student, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Sedigheh Saberi, Email: sedisaberi@yahoo.com