مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۴، شماره۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸(شماره پی در پی۱۳۲)

بررسی اثر عصاره گیاه حنا(*Lawsonia inermis*) بر روی انگل توکسوپلاسما گوندی در محیط‌های برون‌تنی و درون‌تنی

قاسم عسگری، فتانه میکائیلی*، بتول احمدی، محمد صالح بحرینی

گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: توکسوپلاسموز یکی از بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد که به وسیله تک یاخته توکسوپلاسما گوندی ایجاد می‌شود. گیاه حنا(*Lowsonia inermis*) در مقابل طیف وسیعی از بیماری‌ها اثر بخشی دارد. از آنجایی که داروهای پیریمتامین و سولفادیازین به عنوان داروهای رده اول درمان توکسوپلاسموز دارای عوارض جانبی می‌باشند و از طرفی با وجود افزایش مقاومت روز افزون انگل‌ها به داروهای شیمیایی، درمان‌های سنتی و استفاده از گیاهان دارویی از رونق خاصی برخوردار شده است، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدروالکلی حنا بر روی انگل توکسوپلاسما گوندی در محیط‌های درون‌تنی و برون‌تنی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که بر روی ۳۵ سر موش بالب‌سی انجام شد، ابتدا نمونه برگ‌های حنا تهیه و عصاره‌گیری با استفاده از اتانول ۸۰ درصد انجام شد. اثر مستقیم عصاره هیدروالکلی حنا با غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی تاکی زوئیت توکسوپلاسما به روش فلوسایتومتری بررسی شد. به منظور ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره حنا در محیط درون‌تنی از ۳۵ سر موش بالب سی استفاده شد که ۴ گروه ۵ تایی از موش‌های آلوده با تاکی زوئیت توکسوپلاسما غلظت‌های ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی حنا را به صورت گاواژ دریافت کردند. یک گروه ۵ تایی از موش‌های آلوده با تاکی زوئیت توکسوپلاسما دریافت کننده داروی سولفادیازین به عنوان گروه کنترل مثبت و یک گروه ۵ تایی از موش‌های آلوده با تاکی زوئیت توکسوپلاسما بدون تجویز دارو به عنوان کنترل منفی و یک گروه ۵ تایی از موش‌ها برای سنجش اثر سمیت عصاره حنا در نظر گرفته شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون های آماری کاپلان مایر و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتیجه فلوسیتومتری نشان داد IC50 حنا بر روی تاکی زوئیت توکسوپلاسما ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است. نتایج اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره حنا در محیط درون‌تنی نشان داد که در بین گروه‌های آزمون که با غلظت‌های مختلفی از عصاره تحت درمان قرار گرفته بودند و مقایسه با کنترل مثبت و منفی اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف و میزان زنده ماندن موش‌ها($p=0.85$) گزارش نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان اثر عصاره هیدروالکلی حنا در شرایط درون‌تنی قابل توجه و معنی‌دار نمی‌باشد، هر چند که در شرایط برون‌تنی مؤثر است که می‌توان عدم تأثیر عصاره در شرایط درون‌تنی را به دلیل عدم جذب مناسب دارو در دستگاه گوارش، مشکلات حین گاواژ، متابولیزه شدن دارو و کلیرانس سریع دارو از خون در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، برون تنی، درون تنی، *Lawsonia inermis*، ضد توکسوپلاسما

نویسنده مسئول: **فتانه میکائیلی**، شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

Email: mikaeelf@sums.ac.ir

مقدمه

توکسوپلاسموز یکی از بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد که به وسیله تک یاخته توکسوپلاسما گوندی ایجاد می‌شود. میزبان نهایی توکسوپلاسما گربه و گربه سانان بوده و مهره‌داران خونگرم از جمله انسان به عنوان میزبان واسط آن مطرح می‌باشد(۱). بر اساس بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک، در حدود یک سوم از جمعیت جهان دارای آنتی‌بادی ضد این انگل در سرم خون خود هستند. توکسوپلاسما عموماً به وسیله خوردن غذا و آب آلوده به اووسیست دفع شده از گربه‌ها یا با خوردن گوشت خام و نیم پز حاوی کیست بافتی انتقال می‌یابد. تظاهرات پاتولوژیکی و بالینی توکسوپلاسموز به سویه انگل، میزان حساسیت میزبان، راه ورود، مرحله آلوده کننده، دوز دریافتی و عضوی که انگل در آن مستقر می‌شود بستگی دارد(۲).

توکسوپلاسموزیس انسان را می‌توان در اشکال اکتسابی، مادرزادی و بیماری در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف توصیف کرد. توکسوپلاسموز اکتسابی در افراد سالم از لحاظ سیستم ایمنی معمولاً بدون علامت است و به طور خود به خود بهبود می‌یابد، اما در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف مانند؛ افراد مبتلا به ایدز، انسفالیت‌های بدخیم توکسوپلاسمایی ایجاد می‌کند. مهم‌ترین تظاهرات بالینی توکسوپلاسموز مادرزادی، کوریورتینیت، کلسیفیکاسیون مغزی، هیدروسفالی، میکروسفالی و عقب افتادگی ذهنی می‌باشد(۳). تشخیص توکسوپلاسموز در انسان معمولاً بر اساس روش‌های ایمونولوژیکی، بیولوژیکی، هیستولوژیکی و مولکولی می‌باشد(۴). توکسوپلاسموز اکتسابی در افراد با سیستم ایمنی طبیعی اغلب نیاز به درمان ندارند، مگر این که تب و شواهدی از درگیری بدن وجود داشته باشد که در این افراد از ترکیب دو داروی پیریمتامین و سولفادیازین استفاده می‌شود. برای افراد دچار نقص سیستم ایمنی علاوه بر ترکیب پریمتامین و سولفادیازین از ترکیب پیریمتامین و کلیندامایسین نیز استفاده می‌شود. در زنان باردار مبتلا به توکسوپلاسموز از داروی اسپیرومایسین برای کاهش خطر انتقال توکسوپلاسما از مادر به جنین استفاده می‌شود و از ترکیب پیریمتامین و سولفادیازین در شرایط بسیار وخیم و حساس استفاده می‌شود. در کودکان مبتلا به توکسوپلاسموز مادرزادی نیز همانند سه گروه قبل از دو داروی پیریمتامین و سولفادیازین استفاده می‌شود(۷-۵). به علت داشتن عوارض جانبی داروهای نامبرده از جمله؛ افزایش خطر سرکوب عملکرد سیستم مغز استخوان، سمیت هماتولوژیک، اثرات تراتوژنیک و عوارض کلیوی معرفی داروهای مؤثر با حداقل اثرات جانبی و اثربخشی مطلوب در درمان توکسوپلاسموز ضروری به نظر می‌رسد. از جمله این داروهای مؤثر فراورده‌های حاصل از گیاهان دارویی است که یک منبع مهم برای کشف داروهای جدید به خصوص در درمان عفونت‌های انگلی هستند.

گیاه حنا(Lowsonia Inermis) دارای خواص ضدمیکروبی از جمله؛ ضد باکتری، ضدویروسی، ضد قارچی و ضدانگلی بسیار خوبی است(۱۱-۸). ماده مؤثر عصاره حنا(C10H6O3) Lawsone می‌باشد که یک نوع نفتوکینون است که به صورت تغلیظ شده در برگ‌های حنا به خصوص دمبرگ وجود دارد(۱۲ و ۸). بر اساس پژوهش‌های انجام شده، نشان داده شده است که مکانیسم عمل نفتوکینون در مورد انگل‌های اپی‌کامپلکس‌ها مشترک است و آنها از باند شدن زنجیره انتقال الکترون حاوی سیتوکروم جلوگیری کرده و از این طریق اکسیداسیون میتوکندریایی را مهار می‌کنند. این مکانیسم باعث می‌شود که غشای میتوکندری ارگانیسم از بین برود و ساخت اسید نوکلئیک نیز دچار مشکل شود(۱۳). آتوواکان که از نظر ساختاری بسیار شبیه کوآنزیم Q است یک هیدروکسی نفتوکینون است و مکانیسم اثر آن در مقابل پلاسمودیم، مهار اتصال Ubiquinone به سیتوکروم b می‌باشد و قابل توجه است که مشتقات آتوواکان با هسته هیدروکسی نفتوکینون نقش بسیار مهمی علیه عفونت‌های انگلی دارند(۱۴).

از آنجایی که داروهای پیریمتامین و سولفادیازین به عنوان داروهای رده اول درمان توکسوپلاسموز(۱۵) دارای عوارض جانبی هستند به طوری که مصرف پیریمتامین باعث افزایش خطر سرکوب عملکرد سیستم مغز استخوان، سمیت هماتولوژیک و اثرات تراتوژنیک است و مصرف سولفادیازین باعث عوارض کلیوی به خصوص در بیماری ایدزی می‌شود(۱۷ و ۱۶) و از طرفی با وجود افزایش مقاومت روز افزون میکروارگانیسم‌ها از جمله انگل‌ها به داروهای شیمیایی، لذا در این تحقیق اثر عصاره گیاه حنا بر روی توکسوپلاسما در محیط درون‌تنی و برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره حنا در محیط درون‌تنی از ۳۵ سر موش نژاد بالب‌سی با سن ۶ هفته و وزن ۳۰ گرم استفاده شد. در ابتدا برای تهیه، تکثیر و آماده‌سازی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی، تاکی زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسما به صورت داخل صفاقی به موش‌های بالب‌سی تزریق شد. پس از ۷۲ ساعت موش‌ها با رعایت موازین اخلاقی کشته و اطاله گردیدند. تاکی زوئیت‌ها با استفاده از PBS (Phosphate-buffered saline) و سرنگ ۵ سی‌سی از محوطه صفاقی جمع‌آوری و سپس با PBS شستشو داد شدند. مایع آسپیره شده با فشار از سر سوزن‌هایی با اندازه ۲۸ عبور داده شد تا انگل‌های درون سلولی به صورت مکانیکی از سلول‌های میزبان آزاد گردند. سپس مایع فوق به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰ g سانتریفیوژ شد تا بقایای سلولی جدا و خلوص تاکی زوئیت‌های عاری از سلول افزایش یابد. پس از آن مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشته شد و با دور ۸۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۲ بار با PBS استریل با

pH=۷/۲ شستشو داده شد و در نهایت انگل به فرم تاکی زوئیت با خلوص بالا آماده گردید.

اثر Mortality عصاره هیدروالکلی حنا بر روی انگل توکسوپلاسما در محیط برون‌تنی به روش فلوسایتومتری بررسی شد. در ابتدا نمونه برگ‌های حنا در زمستان ۱۳۹۴ از استان بوشهر(28°58'N 50°50'E) جمع‌آوری و در دانشکده داروسازی شیراز مورد بررسی قرار گرفت و در بخش هرباریوم با voucher number 775 ثبت و نگهداری شد. پس از خشک کردن برگ‌های حنا به دور از نور خورشید، عصاره‌گیری در بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی انجام شد. ۱۰۰ گرم از پودر برگ حنا به وسیله دستگاه پرکولاتور با استفاده از اتانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. حلال عصاره به وسیله پمپ خلاء خارج و فرآیند آب‌گیری از عصاره به وسیله دستگاه دسیکاتور انجام شد تا عصاره تغلیظ گردد. برای انجام آزمایش، غلظت‌های مختلف(۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره هیدروالکلی حنا با استفاده از PBS تهیه شد و برای ارزیابی اثرات ضدتوکسوپلاسمایی مورد استفاده قرار گرفت. به سوسپانسیون حاوی تاکی زوئیت (۲×۱۰^{۵} تاکی زوئیت در ۱ سی‌سی PBS)، یک میلی‌لیتر عصاره در غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزوده شد. پس از در معرض قرار دادن انگل با غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۲ ساعت، نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در شرایط تاریکی تحت رنگ‌آمیزی Propidium Iodide با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت که مکانسیم آن رنگ‌آمیزی DNA در حالت مرگ سلولی و مرگ از پیش تعیین شده می‌باشد. سپس نمونه‌های فوق به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل و جهت ارزیابی میزان مرگ انگل به وسیله رنگ مورد استفاده و در نتیجه به دست آوردن میزان واقعی مرگ انگل به وسیله عصاره حنا در هر نوبت از آزمایش، به طور جداگانه و به عنوان شاهد، یک لوله حاوی ۲×۱۰^{۵} انگل به همراه رنگ با غلظت مذکور نیز به وسیله دستگاه فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. از سوسپانسیون تاکی زوئیت توکسوپلاسما درPBS به عنوان کنترل منفی و از سوسپانسیون تاکی زوئیت توکسوپلاسما در PBS به همراه ساپونین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و نتایج حاصل از نمونه‌های اصلی با نمونه‌های کنترل مقایسه گردید. تمام آزمایش‌ها به صورت سه گانه در یک زمان انجام و سه بار در زمان های مختلف با شرایط یکسان تکرار شد.

برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره حنا در محیط درون تنی از ۳۵ سر موش نژاد بالب‌سی استفاده شد که موش ها به ۷ گروه پنج تایی تقسیم شدند. ۶ گروه ۵ تایی از موش‌ها به صورت زیر جلدی با ۲×۱۰^{۵} عدد تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی سویه RH آلوده شدند و یک گروه ۵ تایی از موش‌ها برای سنجش اثر سمیت عصاره حنا با نهایت

دوز(۱۲۸ میکروگرم بر کیلوگرم) در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت بعد از تزریق تاکی زوئیت‌ها به موش‌ها؛ عصاره حنا با غلظت ۱۶ میکروگرم بر کیلوگرم به گروه اول موش‌ها، ۳۲ میکروگرم بر کیلوگرم به گروه دوم موش‌ها، ۶۴ میکروگرم بر کیلوگرم به گروه سوم موش‌ها و ۱۲۸ میکروگرم بر کیلوگرم به گروه چهارم موش‌ها روزانه به مدت یک هفته گاواژ داده شد، گروه پنجم موش‌ها به عنوان گروه کنترل مثبت داروی سولفادیازین را با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند و یک گروه پنج تایی بدون تجویز دارو به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. موش‌ها روزانه به مدت ۷ روز از نظر زنده بودن گروه‌های کنترل و تعداد روزهای بقا برای هر یک از موش‌ها بررسی شدند. تمام مراحل پژوهش مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی با مجوز کمیته اخلاق با کد پژوهشی ۸۷۹۴-۰۱-۰۱-۹۳ انجام گردید.

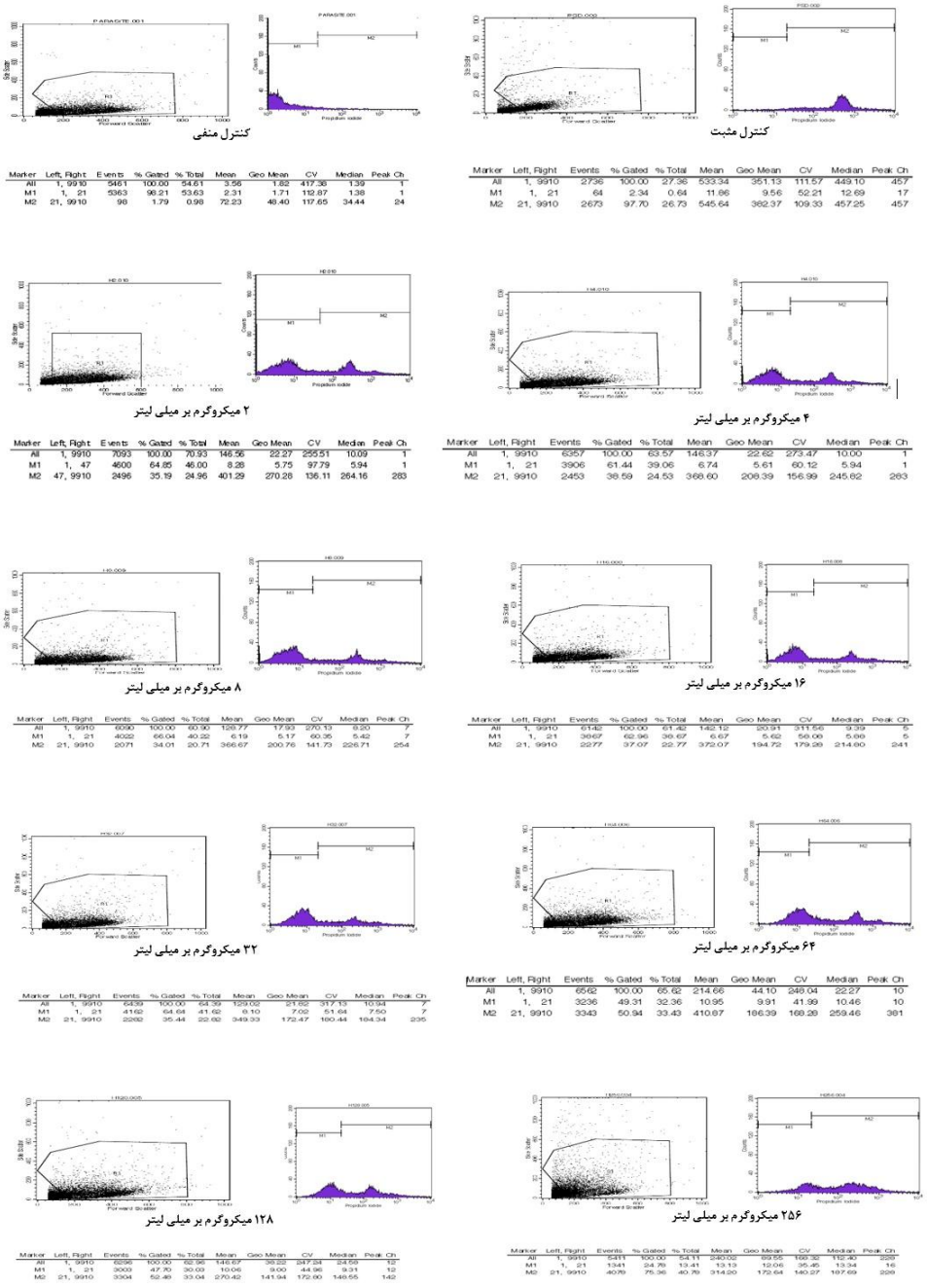
برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره حنا در محیط برون تنی و تعیین غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد(IC50) از مدل رگرسیون خطی با استفاده از نرم افزار Excel استفاده شد که در این طرح رابطه بین تغییر غلظت و میزان مرگ و میر انگل مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره حنا در محیط درون تنی از روش آماری کاپلان مایر با آنالیز بقا یا تحلیل بقا استفاده شد که در آن متغیر مطلوب، زمان مرگ موش‌ها است. برای تعیین تفاوت گروه‌های موش از نظر میزان بقا از نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در سطح $p<0/05$ استفاده شد.

یافته‌ها

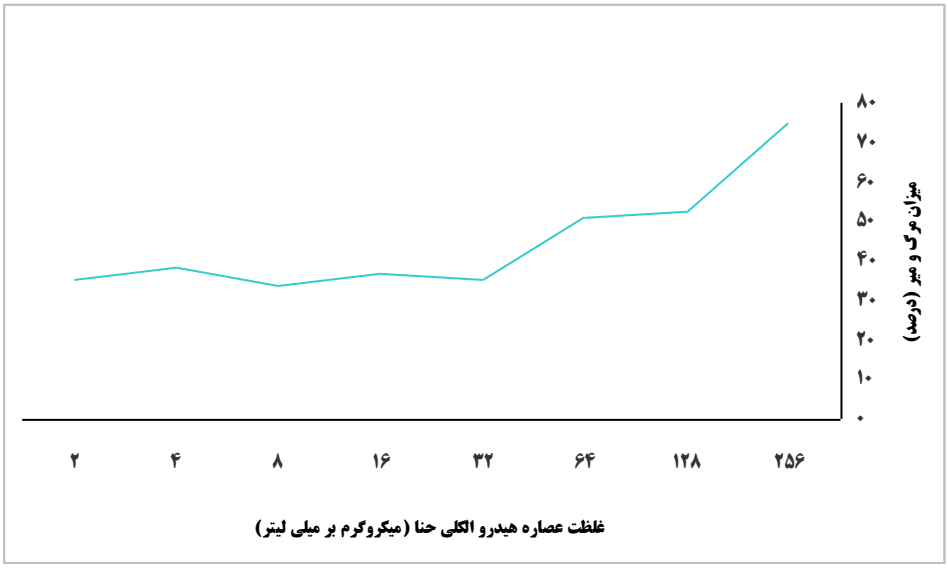
در نتایج فلوسایتومتری از روی رنگ‌پذیری سلول‌های مرده و مرگ پیش تعیین شده در طیف اندازه انگل توکسوپلاسما، مقادیر رنگ‌پذیری انگل‌ها در قسمت m2 (تصویر ۱) بیان شده است. نتیجه فلوسیتومتری نشان داد که میزان مرگ برنامه‌ریزی شده در غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی حنا به ترتیب ۳۵/۱۹، ۳۸/۵۹، ۳۴/۰۱، ۳۷/۰۷، ۳۵/۴۴، ۵۰/۹۴ و ۵۲/۴۹ و ۷۵/۳۶ درصد بود. در نمونه کنترل مثبت به میزان ۹۷/۷۰ درصد و در کنترل منفی ۱/۷۹ درصد از تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما از بین رفتند(تصویر ۱). با توجه به نمودار رگرسیون خطی و اتصال مرگ و میر ۵۰ درصد به محور غلظت ها مشاهده شد که در دوز تقریبی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی حنا ۵۰ درصد از تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما از بین رفتند(نمودار ۱).

نتیجه اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره حنا در محیط درون تنی نشان داد که در گروه کنترل مثبت و گروهی که برای سنجش اثر سمیت عصاره حنا در نظر گرفته شده بودند، پس از ۷ روز تمام موش‌ها زنده ماندند، اما در گروه کنترل منفی و گروه‌های دریافت کننده عصاره هیدروالکلی با غلظت‌های متفاوت، موش‌ها از روز ۴ و ۵ از بین رفتند(جدول ۱).

در بین گروه‌های آزمون که با غلظت‌های مختلفی از عصاره تحت درمان قرار گرفته بودند و مقایسه با کنترل مثبت و منفی، اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف و میزان زنده ماندن موش‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس(p=۰/۸۵) گزارش نشد.



تصویر۱: نتایج فلوسایتومتری تاکی زوئیت‌های *توکسوپلاسما* در حضور عصاره هیدرالکلی *Lawsonia inermis* با غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و گروه کنترل مثبت(سوسپانسیون تاکی زوئیت *توکسوپلاسما* در PBS به همراه ساپونین) و کنترل منفی(سوسپانسیون تاکی زوئیت *توکسوپلاسما* در PBS)



نمودار ۱: منحنی خطی میزان مرگ و میر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرالکلی *Lawsonia inermis* بر روی تاکی زوئیت‌های *توکسوپلاسما*

جدول ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرالکلی *Lawsonia inermis* روی میزان بقای موش‌های مورد مطالعه

غلظت عصاره (میکروگرم بر کیلوگرم)	غلظت عصاره	مرگ موش‌ها بر اساس روزها							میانگین بقا
		روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵	روز ۶	روز۷	
۱۶	۵	۰	۰	۰	۰	۲	۳	۰	۵/۶ روز
۳۲	۵	۰	۰	۰	۱	۰	۴	۰	۵/۶ روز
۶۴	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۰	۶ روز
۱۲۸	۵	۰	۰	۰	۳	۱	۱	۰	۶ روز
اثر سمیت عصاره	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	–
کنترل مثبت	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	–
کنترل منفی	۵	۰	۰	۰	۰	۳	۲	۰	۵/۴ روز

بحث

با توجه به وجود عوارض جانبی داروهای پیریمتامین و سولفادیازین و همچنین افزایش مقاومت روز افزون انگل‌ها به داروهای شیمیایی(۱۷ و ۱۶)، لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره گیاه حنا بر روی توکسوپلاسما در محیط درون‌تنی و برون‌تنی بود.

محصولات طبیعی و عصاره گیاهان منابع با ارزشی برای درمان بیماری‌های ایجاد شده به وسیله انگل‌ها می‌باشند(۱۸). در چند دهه اخیر تأثیر عصاره گیاهان مختلف بر روی تاکی زوئیت توکسوپلاسما بررسی شده است(۲۳-۱۹)، اما تاکنون از گیاه حنا به عنوان داروی ضد توکسوپلاسموزیس استفاده نشده است. در این مطالعه عصاره هیدروالکلی حنا فقط در

شرایط برون‌تنی روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما مؤثر بود و غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توانست ۵۰ درصد از تاکی‌زوئیت‌ها را از بین ببرد و در شرایط درون‌تنی میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های دریافت کننده عصاره نسبت به گروه کنترل منفی تفاوتی نداشت.

مطالعات مختلف نشان داده است که عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های مختلف دارای اثرات مهاری یا کشندگی بر روی توکسوپلاسما می‌باشند. نوذری و همکاران اثر کشندگی عصاره‌های گیاهان افسنطین، زنیان و غوزه پنبه را بر تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که هر سه عصاره اثر کشندگی بر تاکی زوئیت‌ها داشتند و این اثر برای افسنطین و زنیان از غوزه پنبه بیشتر بود(۲۰). در مطالعه حاضر نیز عصاره حنا در شرایط برون‌تنی اثر کشندگی بر تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما داشت. در مطالعه آهنگ و همکاران تأثیر عصاره الکلی خام پیکر گیاه اکیناسه بر توکسوپلاسما در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی ارزیابی شد که این عصاره فقط در شرایط درون‌تنی بر روی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما مؤثر بود(۲۱)، اما در مطالعه حاضر، نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی حنا فقط در شرایط برون‌تنی بر روی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما مؤثر است و در شرایط درون‌تنی میانگین زمان بقای موش‌ها در گروه‌های دریافت کننده عصاره نسبت به گروه کنترل منفی تفاوتی نداشت. ابراهیم‌زاده و همکاران فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره متانولی گیاهان فیجوآ(Feijoa sellowiana)، بلندمازو(Quercus castaneifolia) و آلیوم پارادوکسوم (Allium paradoxum) را در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی مورد بررسی قرار دادند که عصاره متانولی فیجوآ فعالیت ضد توکسوپلاسمایی قوی را نشان داد(۲۳). در مطالعه حاضر عصاره هیدروالکلی حنا فقط در شرایط برون تنی بر روی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما اثر داشت.

پژوهش‌های مختلف نشان داده است که عصاره Lawsonia inermis شامل؛ Lawsone که از مشتقات نفتوکینون است، می‌باشد. این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی است و در پژوهش‌ها و تحقیقاتی که تاکنون صورت گرفته تلاش بر این بوده است که با توجه به حضور نفتوکینون در برگ‌های حنا از آن در درمان انواع بیماری‌ها بهره گرفته شود(۱۱ و ۱۰). تأثیر ضد باکتری عصاره برگ گیاه حنا بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی گزارش شده است(۸). ابوالزید و همکاران فعالیت ضدباکتریایی عصاره برگ حنا را بر روی اشرشیا کلی در شرایط برون‌تنی گزارش کردند(۹). در مطالعه‌ای دیگر تأثیر ضد باکتری حنا بر روی سودوموناس گزارش شد(۲۴). تأثیر ضد قارچی عصاره برگ حنا بر روی بعضی قارچها گزارش شده است که سلیمان و همکاران تأثیر عصاره اتانولی حنا را بر روی تعدادی از قارچهای پاتوژن مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد که عصاره حنا می‌تواند به عنوان یک عامل ضد قارچی

مطرح شود(۲۵) برنجی و همکاران اثر عصاره کلروفرمی، متانولی و آبی حنا را بر روی گونه‌های مالاسزیا مورد مطالعه قرار دادند که عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف مانع رشد قارچ شد و نتایج نشان داد عصاره آبی نسبت به عصاره متانولی و کلروفرمی مؤثرتر بوده است(۲۶). در مطالعه حاضر از عصاره هیدروالکلی حنا استفاده شده است.

در مورد اثر نفتوکینون‌ها و مشتقات آن بر روی انگل‌های مختلف نیز تحقیقاتی صورت پذیرفته است. از جمله می‌توان به مطالعه معتضدیان و همکاران اشاره داشت که در آن غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی حنا قادر به از بین بردن ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌های لیشمانیا در شرایط برون تنی بود(۱۱). در مطالعه حاضر نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی حنا(IC50=۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) فقط در شرایط برون‌تنی بر روی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما مؤثر می‌باشد. در مطالعه فتاحی بافقی و همکاران پس از بررسی اثر عصاره حنا بر زخم سالک در موش، نتایج نشان داد با این که عصاره گسترش و افزایش میانگین اندازه قطر زخم را به طور محسوسی کاهش داد، اما تمام موش‌ها از بین رفتند(۲۷). بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، زمان بقای موش‌های آلوده با زمان بقای گروه موش‌های شاهد در شرایط درون تنی تفاوتی نداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان اثر عصاره هیدروالکلی حنا در شرایط درون تنی قابل توجه و معنی‌دار نمی‌باشد، هر چند که در شرایط برون‌تنی مؤثر است که می‌توان عدم تأثیر عصاره در شرایط درون‌تنی را به دلیل عدم جذب مناسب دارو در دستگاه گوارش، مشکلات حین گاواژ، متابولیزه شدن دارو و کلیرانس سریع دارو از خون در نظر گرفت. البته پژوهش‌های بیشتر با غلظت‌های بیشتری از عصاره به منظور پیدا کردن lethal dose، استفاده از روش‌های دیگر عصاره‌گیری برای افزایش بازده و میزان اثربخشی، استفاده از حنا به عنوان بخشی از درمان و در ترکیب با داروهای ضد انگل دیگر به صورت هم‌زمان و هم‌چنین شناسایی ترکیب‌های مؤثر و مشخص شدن مکانیسم اثر این ترکیب‌ها پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه دکترای حرفه ای رشته پزشکی بود که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد.

REFERENCES

1.Tenter AM. Toxoplasma gondii in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(2): 364-9.

2.Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol 2004; 126(1-2): 57-72.

3.Ahmadpour E, Daryani A, Sharif M, Sarvi S, Aarabi M, Mizani A, et al. Toxoplasmosis in immunocompromised patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. J Infect Dev Ctries 2014; 8(12): 1503-10.

4.Hill D, Dubey JP. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect 2002; 8(10): 634-40.

5.Rodriguez JB, Szajnman SH. New antibacterials for the treatment of toxoplasmosis; a patent review. Expert Opin Ther Pat 2012; 22(3): 311-33.

6.Alday PH, Doggett JS. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. Drug Des Devel Ther 2017; 11: 273-93.

7.Serranti D, Buonsenso D, Valentini P. Congenital toxoplasmosis treatment. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15(2): 193-8.

8.Babu PD, Subhasree RS. Antimicrobial activities of Lawsonia inermis-a review. Acad J Plant Sci 2009; 2(4): 231-2.

9.Abulyazid I, Elsayed ME, Ragaa M. Biochemical study for the effect of henna (Lawsonia inermis) on Escherichia coli. Arab J Chem 2013; 6(3): 265-73.

10.Tripathi RD, Srivastava HS, Dixit SN. A fungitoxic principle from the leaves of Lawsonia inermis lam. Experientia 1978; 34(1): 51–2.

11.Motazedian MH, Mikaeili F, Mohebali M, Miri R, Habibi P, Kamarloie S. The antileishmanial effects of Lowsonia inermis and Cedrus libani on Leishmania major promastigotes: an in vitro study. J Parasit Dis 2017; 41(2): 375-9.

12.Ashnagar A, Shiri A. Isolation and characterization of 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone (lawsone) from the powdered leaves of henna plant marketed in Ahwaz city of Iran. Int J Chemtech Res 2011; 3(4): 1941-4.

13.Baramee A, Coppin A, Mortuaire M, Pelinski L, Tomavo S, Brocard J. Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum. Bioorg Med Chem 2006: 14(5): 1294-302.

14.Ferreira RA, Oliveira AB, Gualberto SA, Vitor RW. Activity of natural and synthetic naphthoquinones against Toxoplasma gondii, in vitro and in murine models of infection. Parasite 2002; 9(3): 261-9.

15.Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363(9425): 1965-76.

16.Misawa J, Kanda S, Kokue E, Hayama T, Teramoto S, Aoyama H, et al. Teratogenic activity of pyrimethamine in Gottingen minipig. Toxicol Lett 1982; 10(1): 51–4.

17.Dusseault BN, Croce KJ, Pais VMJR. Radiographic characteristics of sulfadiazine urolithiasis. Urology 2009; 73(4): 928. e5-6.

18.Wright CW, Phillipson JD. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. Phytother Res 1990; 4(4): 127–39.

19.Khoshzaban F, Ghaffarifar F, Sharafi M, Ghasemi Nikou S. Evaluation of peganum harmala effect on acute toxoplasmosis in mice. Med Daneshvar J 2008; 75: 27-36.

20.Nozari SH, Azadmehr A, Adine M, Javadi F, Jahanihashemi H, Nassiri-Asl M, et al. In vitro anti-toxoplasma effects of ethanolic extracts of artemisia absinthium L. Carum copticum L and Gossypium hirsutum. JMP 2016; 2(58): 72-9.

21.Ahang S, Haniloo A, Faghih Zadeh S. The efficacy of echinacea purpurea alcoholic extract on toxoplasma in vitro and acute toxoplasmosis in a mouse model. J Zanjan Univ Med Sci 2016; 24(103): 42-51.

22.Powers J, Zhang X, Kim CY, Abugri D, Witola W. Activity of green algae extracts against toxoplasma gondii. Med Aromat Plants Los Angels 2017; 6: 293.
23.Ebrahimzadeh MA, Mohammad Taheri M, Ahmadpour E, Montazeri M, Sarvi SH, Akbari M, et al. Anti toxoplasma effects of methanol extracts of feijoa sellowiana , quercus castaneifolia , and allium paradoxum. J Pharmacopuncture 2017; 20(3): 220-6.
24.Habbal O, Hasson SS, El-Hag AH, Al-Mahrooqi Z, Al-Hashmi N, Al-Bimani Z, et al. Antibacterial activity of Lawsonia inermis Linn (Henna) against Pseudomonas aeruginosa. Asian Pac J Trop Biomed 2011; 1(3): 173-6.
25.Suleiman EA, Mohamed EA. In vitro activity of lawsonia inermis (henna) on some pathogenic fungi. J Mycol 2014; 375932: 5.
26.Berenji F, Rakhshandeh H, Ebrahimipour H. In vitro study of the effects of henna extracts (Lawsonia inermis) on Malassezia species. Jundishapur J Microbiol 2010; 3(3): 125-8.
27.Fatahi Bafghi A, Fallahzadeh H, Mosadegh MH. Effectiveness of lawsonia inermis extract on cutaneous leishmaniasis lesion in BALB/c mice. J Kerman Univ Med Sci 2009; 15(4): 329-35.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Effects of *Lawsonia inermis* Extract on *Toxoplasma gondii* in In-Vitro and In-Vivo Environments

Asgari Q, Mikaali F*, Ahmadi B, Saleh Bahraini M

Department of Parasitology and Mycology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 06 Oct 2018 Accepted: 17 Feb 2019

Abstract

Background & aim: Toxoplasmosis is one of the common parasitic diseases of humans and animals that is caused by a protozoan *Toxoplasma gondii*. Henna plant (*Lowsonia inermis*) is effective against a wide range of diseases. Since pyrimethamine and sulfadiazine medications are first-line drugs for treatment of toxoplasmosis, they have adverse effects. On the other hand, there has been a particular booming despite the increasing resistance of parasites to chemical drugs, traditional treatments and the use of medicinal plants. The aim of this study was to study the effect(s) of henna hydroalcoholic extract on *Toxoplasma gondii* parasite in in-vitro and in-vivo environments.

Methods: The present experimental study was conducted on 35 mice. A sample of Henna leaves was prepared and extracted using 80% ethanol. The direct effect of henna hydroalcoholic extract at concentrations of 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 and 512 µg / ml on *Toxoplasma* tachycardia was investigated by flow cytometry. In order to evaluate the anti-toxoplasmic effect of henna extract on in vivo, 4 groups of 5 mice were infected with *Toxoplasma* tachyzoites of 16, 32, 64, and 128 mg / kg Hana hydroalcoholic extracts concentrations as gavage. A group of 5 mice were infected with tachyzoite of *Toxoplasma* which received sulfadiazine as a positive control group and a group of 5 mice were infected with tachyzoite of *Toxoplasma* without a prescriptive drug as a negative control. Finally a group of 5 mice were considered for measuring toxicity of henna extract. The collected data were analyzed using one-way ANOVA and Kaplan-Meier tests.

Results: Flow cytometric results indicated that IC50 of henna on *Toxoplasma* tachyzoites was 100 µg /ml. The results of the anti-*Toxoplasma* effect of henna extract on intact media indicated that no significant difference were appreciated between different concentrations and survival rate in rats (p = 0.85) among the test groups treated with different concentrations of the extract in compared with positive and negative control.

Conclusion: The results of this study indicated that the effect of henna hydroalcoholic extract on in-vivo settings was not significant, although it was effective in in-vitro environment. The unsuccessfulness of the extract in in-vivo conditions may have been due to inadequate absorption of the drug in the gastrointestinal tract, problems during gavage, the metabolism of the drug and rapid clearance of the drug.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Outcome, Intravenous, *Lawsonia inermis*, Antitoxoplasma

Corresponding Author: Mikaali F, Department of Parasitology and Mycology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Email: mikaeelf@sums.ac.ir

Please cite this article as follows:
Asgari Q, Mikaeili F, Ahmadi B, Bahreini MS. Effects of *Lawsonia Inermis* Extract on *Toxoplasma gondii* in In-Vitro and In-Vivo Environments. Armaghane-danesh 2019; 24(1): 31-42.