مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۴، مهر و آبان ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۴۱)

بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های حاصل از سه نوع جانور دریایی بومی خلیج فارس در شرایط برون تنی

مرادعلی فولادوند[۱*]، مرجان برازجانی[۲]، سلیمان خرمی[۱]، افسون شریعت[۲]، افشین برازش[۳]

[۱]گروه میکروب‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران،[۲]گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، [۳]مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱٤

چکیده

زمینه و هدف: درمان لیشمانیوز به عنوان هفتمین اولویت تحقیقاتی از طرف WHO مطرح شده و با وجود پژوهش‌های زیادی که در این راستا انجام شده است، هنوز درمان مشخصی برای آن وجود ندارد و عوارض جانبی داروهای مرسوم و ظهور مقاومت انگل، استفاده از آنها را دچار چالش مهمی کرده است. اخیراً پژوهش‌های گسترده‌ای بر روی عصاره‌ها و ترکیبات مختلف گیاهی بر ضد انگل لیشمانیا صورت گرفته و حتی استفاده از داروهای با منابع دریایی به دلیل عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیشتر بیماران به این داروها، مورد توجه قرار گرفته است، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های حاصل از سه نوع جانور دریایی بومی خلیج فارس در شرایط برون‌تنی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ انجام شد، هر سه جاندار از آب‌های ساحلی استان بوشهر جمع‌آوری و پس از جداسازی پوسته و احشاء، به روش پرکولاسیون و با استفاده از حلال‌های مختلف، مورد عصاره‌گیری قرار گرفته و اثرات ضدلیشمانیایی و میزان سمیت سلولی این فرآورده ها به ترتیب بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور و سلول‌های vero و بر اساس تست بیوشیمیایی MTT assay مورد ارزیابی واقع شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری LSD در سطح آماری یک درصد تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: آنالیز آماری نشان داد که فاکتورهای مورد بررسی شامل نوع عصاره و غلظت‌های استفاده شده از آن(دوز) دارای تأثیر بسیار معنی‌داری بودند. هم‌چنین اثرات متقابل دوگانه نوع عصاره و دوز، نوع عصاره و حلال و نیز اثر متقابل سه‌گانه نوع عصاره و حلال و دوز بر میزان رشد انگل معنی‌دار شد. بیشترین فعالیت ضدلیشمانیایی مربوط به عصاره‌های متانولی پوسته خیار دریایی(۸۸/۶۵ درصد) و احشاء توتیای دریایی(۸۷/۴۸ درصد) با غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین میزان مربوط به عصاره آبی ستاره دریایی(۴۳/۰۱ درصد) با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل شد.

نتیجه‌گیری: تمامی انواع عصاره‌های پوسته و احشاء سه جاندار دریایی مورد تحقیق دارای اثرات ضدلیشمانیایی بوده که در این میان، بیشترین میزان کشندگی مربوط به عصاره‌های متانولی پوسته خیار دریایی و احشاء توتیای دریایی می‌باشد. هم‌چنین تمامی انواع عصاره‌ها، دارای سمیت بسیار پایینی برای سلول‌های میزبان بوده، لذا قابلیت تجاری سازی به صورت تهیه داروهای مؤثر را پس از انجام پژوهش‌های تکمیلی به صورت درون تنی دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضدلیشمانیایی، ستاره دریایی، توتیای دریایی، خیار دریایی

* **نویسنده مسئول: دکتر مرادعلی فولادوند**، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
Email:mfooladvand39@yahoo.com

مقدمه

بیماری لیشمانیوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد و در بسیاری از کشورهای مناطق گرمسیری و تحت حاره شیوع دارد(۲ و۱). این بیماری در بیش از ۸۰ کشور جهان به صورت اندمیک وجود داشته و یکی از مسایل مهم سلامت جهانی است، طوری که تقریباً ۳۵۰ میلیون نفر از مردم سراسر جهان در معرض آلودگی با این بیماری انگلی قرار دارند(۳). ناقل این بیماری پشه‌های خاکی از جنس فلبوتوموس بوده و به وسیله حداقل ۲۰ گونه تک یاخته انگلی به نام لیشمانیا به وجود می‌آید(۴ و۳). بیماری لیشمانیوز به طور کلی در سه فرم بالینی جلدی، جلدی ـ مخاطی و احشایی مشاهده می‌شود(۵) که فرم جلدی آن رایج‌ترین فرم بیماری بوده و در کتب پزشکی تحت عناوین مختلف نظیر دکمه یا زخم شرقی، جوش دهلی یا بغداد نام برده شده است و در شهرهای ایران همچنین به نام‌های متفاوتی اطلاق می‌شود؛ از آن جمله در تهران سالک، در کرمان و شیراز دانه سال، در سیستان زخم سالی، در سبزوار لکه سال، در مشهد لکه، در اصفهان و یزد و کاشان کپه، در جنوب ایران زخم خرما و در رشت و بندر انزلی خرماتشک نامیده می‌شود(۷ و۶). موارد لیشمانیوز جلدی غالباً به وسیله دو گونه غالب لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا به وجود می‌آید(۸).

درمان لیشمانیوز به عنوان هفتمین اولویت پژوهشی تحقیقاتی از طرف WHO مطرح شده و با وجود پژوهش‌های زیادی که در این راستا انجام شده است، هنوز درمان مشخصی برای آن وجود ندارد و روز به روز شاهد شیوع بیشتر این بیماری هستیم(۹). ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان به نام‌های تجاری گلوکانتیم و پنتوستام از متداول‌ترین داروهایی هستند که جهت درمان لیشمانیوز جلدی در ایران و سایر نقاط دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند و داروی آمفوترسین B در مواردی خاص که ممنوعیت استفاده از داروهای فوق‌الذکر وجود داشته باشد، به عنوان داروی جایگزین در درجه دوم اهمیت قرار دارد(۱۰). کاربرد این ترکیبات علاوه بر داشتن عوارض جانبی، دارای مشکلاتی چون افزایش مقاومت انگل نسبت به آن بوده، طوری که هرساله در جهان ۴۰۰ هزار مورد جدید مقاومت دارویی گزارش می‌شود و این مقاومت همچنان رو به افزایش است(۱۱). بنابراین تهیه داروی مؤثر و مطمئن و عاری از هر گونه عوارض جانبی برای کنترل این بیماری از اهمیت به سزایی برخوردار می‌باشد.

در دهه‌های اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای بر روی عصاره‌ها و ترکیبات مختلف گیاهی بر ضد انگل لیشمانیا صورت گرفته و حتی استفاده از داروهای با منابع دریایی به دلیل عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیشتر بیماران به این داروها، مورد توجه قرار گرفته است(۱۲). در منطقه استان بوشهر و در سواحل خلیج فارس، گونه‌های خاصی از موجودات دریایی به نام‌های خیار دریایی(*Holothuria parva*)، ستاره دریایی(*Ophiocoma scolopendrina*) و توتیای

دریـایی(*Echinometra matheai*) زیسـت مـی‌کننـد کـه پژوهش‌های اخیر نقش ضد ویروسی و ضـدباکتریایی آنهـا را تأییـد مـی‌کننـد(۱۷ـ۱۳). خیـار دریـایی یـک ارگانیسم با ارزش غـذایی و خـواص درمـانی بـالا بـه شمار می‌آید. این جاندار، منبعی غنی از پـروتئین خـام در مقایسه بـا بیشـتر غـذاهای دریـایی بـوده و دارای خواص بیولوژیک مختلف نظیر؛ مهار رگ‌زایی، فعالیت ضدسرطانی و ضدالتهابی می‌باشـد. وجـود سـه نـوع گلیکوزاید تری‌ترپن و دو نوع گلیکوزاید پرویکوزاید C و هولوتورین A به همراه فوکوسـینروزایدهای A، B و C در بافت خیار دریایی، سمیت سلولی قابل توجهی را در برابر دو رده سلولی تومورهای انسانی در شـرایط آزمایشگاهی نشان داده است(۱۸). هـم‌چنـین بـه علـت داشتن موکوپلی‌ساکارید و کندروئیتین، قادر بـه مهـار ویروس‌ها و توانایی تعـادل‌سـازی پروسـتاگلاندین‌هـا بوده و اخیـراً از آن بـرای درمـان HIV اسـتفاده شـده اسـت(۱۹). در تحقیـق دیگـری، اکینوزایـدهای A و B موجـود در عصـاره متـانولی خیـار دریـایی گونـه (*Holothuria polii*) خواص ضد شیستوزومایی قـوی بـر روی فرم بالغ شیستوزوما مانسونی در شرایط برون تنی از خود نشـان داده اسـت. محققـین، ایـن ترکیبـات اکینوزاید را برای توسعه داروهای شیستوزوموسیدال جدید بسیار امیدوارکننده معرفی کرده اند(۲۰). سـتاره دریـایی نیـز جـزو شـاخه خارپوسـتان بـوده و نقـش اکولوژیکی بسـیار بـارزی در اکوسیسـتم دریـا ایفـاء می‌کند. این موجودات توانایی بازسازی بخـش‌هـای از دست رفته بدن خود را دارند. تـرمیم و فرآینـد کلـونی شدن سـتاره‌هـای دریـایی ممکـن اسـت در داروهـای انسانی کاربرد داشته باشد، از این رو شناسـایی آنهـا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است(۱۵). توتیای دریـایی در طبقه‌بندی جزو شاخه خارپوستان بوده و بـه دلیـل دارا بودن پیگمان‌های پلـی هیدروکسـیلات نفتوکینـون نظیـر اسـپینوکروم و اکینـوکروم واجـد اثـرات ضـد باکتریـایی مـی‌باشـد(۱۶). در برخـی از کشـورها، گونه‌های خاصی از توتیای دریایی شکار و بـه عنـوان یک غذای لوکس ارایه مـی‌شـود. منطقـه خلـیج فـارس ایران دارای ذخـایر غنـی از ایـن سـه گـروه جـانوری مـی‌باشـد(۱۷). در مطالعـه‌ای کـه اخیـرا اثـرات اسکولوسیدال عصـاره پوسـته توتیـای دریـایی صـید شده از خلیج فـارس را بـه صـورت بـرون‌تنـی مـورد ارزیابی قـرار داده اسـت، پروتواسـکولکس‌هـای زنـده آسپیره شده از کیست‌های هیداتید کبـد گوسـفند و بـز در مواجهه با غلظت‌های مختلفی از عصاره این جـانور دریـایی قـرار گرفتـه و بـا اسـتفاده از کیـت الایـزای تجـارتی، میـزان آپوپتـوز پروتواسـکولکس‌هـا بـا انـدازه‌گیـری فعالیـت کاسـپاز ۳ بـرآورد شـده اسـت. نویسـندگان مقالـه، ایـن دسـته از ترکیبـات طبیعـی دریـایی را بـه عنـوان پایـه‌ای بـرای درمـان هیداتیـدوزیس در آینـده متصـور شده‌اند(۲۱).

با توجه به این که تـاکنون هـیچ مطالعـه‌ای در ارتباط با اثرات این جانداران بر روی لیشمانیا مـاژور انجام نشـده بـود؛ لـذا هـدف از ایـن مطالعـه تعیـین و بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های حاصل از سه

نوع جانور دریایی بومی خلیج فارس در شرایط برون‌تنی بود.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام شد.

خیار دریایی(*Holothuria parva*) و توتیای دریایی(*Echinometra matheai*) از آب‌های ساحلی بندر بوشهر و ستاره دریایی(*Aquilonastra burtoni*) از سواحل نای‌بند بندر عسلویه در عمق‌های به ترتیب ۳۰، ۱۰۰ و ۱۰ سانتی‌متری آب، در زمان جزر دریا جمع‌آوری شدند و پس از شستشو، نام علمی و گونه آن‌ها تأیید شد. سپس خارها و پوسته خارجی توتیای دریایی و هم‌چنین بخش بیرونی خیار دریایی به صورت مکانیکی از بخش درونی و احشاء شکمی آنها جدا شده و در هاون کاملاً له و به وسیله دستگاه هموژنایزر همگن شد. در نهایت بافت‌های به دست آمده به طور جداگانه به وسیله دستگاه فریز درایر، لیوفیلیزه شدند. در مورد ستاره دریایی، به دلیل نبود بافت همبند و عدم امکان جداسازی بخش‌های بیرونی و درونی از همدیگر، به صورت یکدست همگن شده و لیوفیلزه شد.

از روش پرکولاسیون برای این منظور استفاده شد؛ به طور مختصر، ۲۰۰ گرم از پودر هر کدام از نمونه‌ها در حجم ۱۲۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های آب، متانول و دی‌کلرومتان برای تهیه سه نوع عصاره آبی، متانولی و دی‌کلرومتانی به طور جداگانه مخلوط و بر روی روتاری عصاره‌گیری شدند. پس از فیلتر نمودن عصاره‌های مربوطه، به وسیله دستگاه فریز درایر به صورت پودر لیوفیلیزه آماده شدند.

پودرهای مربوط به عصاره‌های فرآوری شده با حلال‌های آبی و متانولی در بافر PBS و پودرهای تهیه شده با حلال دی‌کلرومتان با استفاده از مخلوط سرم فیزیولوژی استریل و گلیسیرین، حل شد و عصاره‌هایی با غلظت‌های سریالی مشخص(۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تنظیم شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

سویه استاندارد تک یاخته لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و برای نگه‌داری طولانی مدت به محیط کشت N.N.N انتقال داده شد.

برای کشت انبوه انگل از محیط کشت تک فازی مایع RPMI-1640 استفاده شد. پس از رسیدن انگل‌ها به فاز ایستایی رشد(Stationary Phase)، تعداد انگل‌ها به وسیله لام هموسیتومتر شمارش شده و سوسپانسیونی از آن با غلظت 10^6 انگل در هر میلی‌لیتر محیط کشت تهیه و به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای جهت انجام آزمایش انتقال داده شد.

سلول‌های vero از تانک ازت مایع خارج‌سازی شده و در محیط RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گوساله در فلاسک‌های کشت سلولی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

سلول‌های vero تحت کشت، پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، به وسیله تریپسین از جدار فلاسک کشت سلولی جداسازی شده و با استفاده از رنگ‌تریپان بلو مورد رنگ‌آمیزی و شمارش واقع شدند. سوسپانسیونی از سلول‌ها با تعداد مشخص تهیه و تعداد یک صد هزار سلول به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

در مرحله بعدی، میزان پانصد میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های تهیه شده از عصاره‌های فوق‌الذکر به چاهکها اضافه و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوباسیون ادامه یافت. جهت ارزیابی میزان سمیت عصاره‌های مذکور بر روی سلول‌های vero، از تست MTT assay استفاده شد. به صورت مختصر، پس از افزودن محلول MTT در غلظت پنج میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر کدام از چاهک‌های حاوی سلول‌های vero مواجه شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و انکوباسیون آن به مدت چهار ساعت در تاریکی، کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در چاهکها به وسیله محلول DMSO حل گردیده و شدت رنگ حاصله در طول موج ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا ریدر(Biotech, Highland Park Winooski, USA) قرائت شدند.

از سوسپانسیون انگلی تهیه شده از قبل، میزان یک صد میکرولیتر(معادل یک صد هزار انگل) به هر کدام از چاهک‌های میکروپلیت‌ها اضافه و سپس به همان میزان، رقت‌های تهیه شده از انواع عصاره‌ها به چاهکها افزوده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. برای ارزیابی میزان اثر ضدلیشمانیایی عصاره‌های مورد تحقیق، از تست MTT assay به همان روش توضیح داده شده قبلی استفاده شد. توضیح این که تمامی آزمایش‌ها در سه مرحله تکرار شدند و کنترل منفی تست شامل؛ محیط کشت RPMI، پروماستیگوت و کنترل مثبت نیز حاوی محیط کشت، پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و داروی گلوکانتیم با غلظت‌های مشابه عصاره‌ها بود.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارSPSS و آزمون آماری LSD در سطح آماری یک درصد تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

میزان سمیت سلولی(Cell cytotoxicity) عصاره‌های متانولی قشرهای بیرونی و هم‌چنین احشاء داخلی هر سه جاندار دریایی(ستاره دریایی، خیار دریایی و توتیای دریایی) بر روی سلول‌های vero اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که بافت ستاره دریایی، پوسته و احشاء خیار دریایی، پوسته و احشاء توتیای دریایی در دوز ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، باعث مرگ به ترتیب ۱۸/۷۰، ۱۷/۴۶، ۱۷/۷۱، ۱۸/۷۹ و ۲۱/۱۵ درصد از سلول‌های vero شدند. نکته قابل توجه این که در هر پنج نوع عصاره متانولی مربوط به

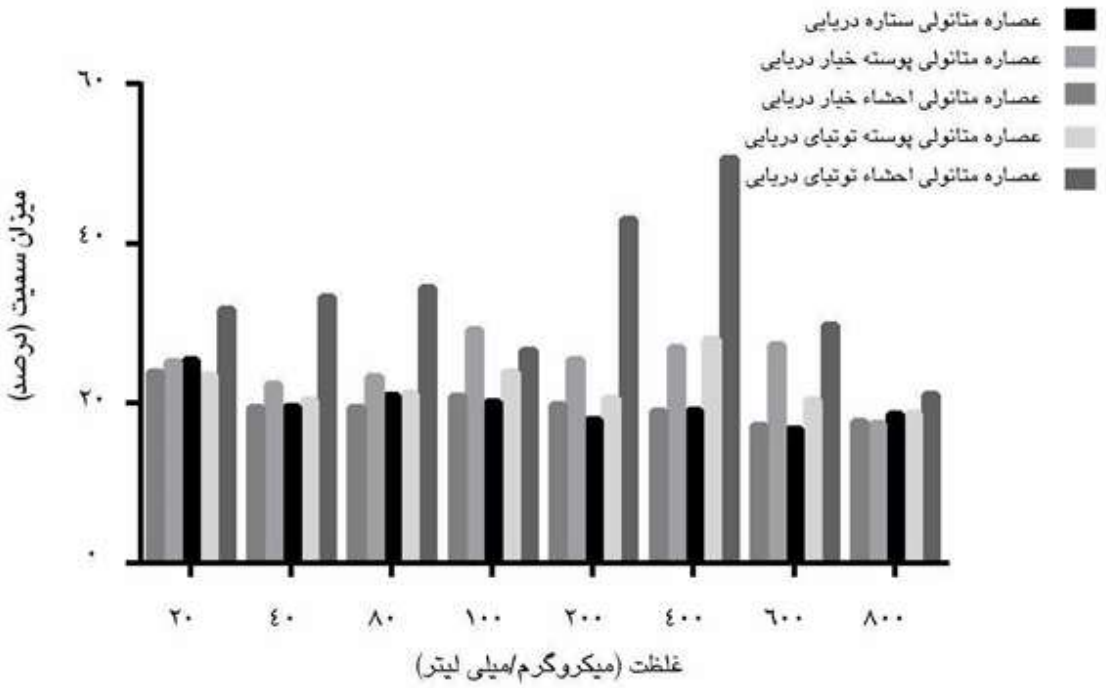
هر سه جاندار، با افزایش غلظت عصاره، درصد کشندگی برای سلول‌های vero پایین می‌آید، طوری که کمترین میزان توکسیسیتی در بالاترین غلظت به کار رفته(۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد(نمودار ۱).

نتایج بررسی، اثرات بازدارندگی تمامی انواع عصاره‌های پوسته و احشاء سه جاندار دریایی مورد تحقیق که با حلال‌های آبی، متانولی و دی‌کلرومتانی استخراج شده بودند را بر روی رشد انگل لیشمانیا ماژور تأیید می‌نماید. میزان کشندگی در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های آبی، متانولی و دی‌کلرومتانی ستاره دریایی به ترتیب؛ ۷۷/۹۵، ۸۳/۳۴ و ۷۶/۹۸ درصد و برای پوسته خیار دریایی به ترتیب؛ ۸۰/۴۶، ۸۸/۶۵ و ۷۷/۱۸ درصد به دست آمد. همچنین این میزان در مورد احشاء خیار دریایی، ۷۱/۶۲، ۸۰/۰۶ و ۷۹/۵۵ درصد و برای پوسته توتیای دریایی ۴۹/۲۶، ۶۶/۸۰ و ۶۲/۸۳ درصد و در رابطه با احشاء توتیای دریایی مقادیر ۶۱/۵۰، ۸۷/۴۸ و ۸۱/۱۸ درصد به ترتیب در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی، متانولی و دی‌کلرومتانی حاصل گردید. بیشترین میزان کشندگی مربوط به عصاره‌های متانولی پوسته خیار دریایی(۸۸/۶۵ درصد) و احشاء توتیای دریایی(۸۷/۴۸ درصد) با غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین میزان مربوط به عصاره آبی ستاره دریایی(۴۳/۰۱ درصد) با غلظت ۲۰ میکروگرم بر لیتر می‌باشد. اثر عصاره دی کلرومتانی احشاء خیار دریایی در غلظت ۱۰۰ میکرومول مشهودتر از سایر تیمارها بود که باعث کاهش رشد انگل به میزان ۷۴/۷ درصد گردید. عصاره متانولی احشاء توتیای دریایی نیز با دوز ۴۰۰ میکروگرم بر لیتر دارای اثر بازدارندگی ۷۶/۵ درصد بر روی رشد انگل بود(جدول ۱).

تجزیه واریانس نشان داد که فاکتورهای مورد بررسی شامل نوع عصاره و غلظت‌های استفاده شده از آن (دوز)، دارای تأثیر بسیار معنی‌داری بودند. همچنین اثرات متقابل دوگانه نوع عصاره و دوز، نوع عصاره و حلال و نیز اثر متقابل سه‌گانه نوع عصاره و حلال و دوز بر میزان رشد انگل معنی‌دار شد(جدول ۲).

بحث

استفاده از داروهای با منابع دریایی به دلیل عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیشتر بیماران به این داروها، در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است(۱۲). گونه‌های خاصی از موجودات دریایی به نام‌های خیار دریایی، ستاره دریایی و توتیای دریایی در سواحل منطقه استان بوشهر زیست می‌کنند که پژوهش‌های انجام گرفته در سال‌های اخیر، خواص بیولوژیکی و آنتی‌بیوتیکی متعددی نظیر اثرات ضد ویروسی و ضد باکتریایی را به این جانداران دریایی نسبت می‌دهند(۱۷-۱۳)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های حاصل از سه نوع جانور دریایی بومی خلیج فارس در شرایط برون‌تنی بود.



نمودار ۱: میزان سمیت عصاره‌های متانولی ستاره دریایی، خیار دریایی و توتیای دریایی در غلظت‌های مختلف

جدول ۱: فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره‌های آبی، متانولی و دی کلرومتانی سه جاندار ستاره دریایی، خیار دریایی و توتیای دریایی در غلظت‌های مختلف بر روی انگل لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی

نام جاندار دریایی	حلال ـ غلظت	غلظت عصاره ها (میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشندگی(درصد)							
		۲۰	۴۰	۸۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۶۰۰	۸۰۰
	آبی	۴۳/۰۱	۴۷/۰۱	۴۹/۲۲	۶۰/۴۸	۶۰/۱۸	۶۰/۵۱	۶۲/۲۷	۷۷/۹۵
ستاره دریایی	متانولی	۶۰/۱۱	۶۱/۷۲	۶۵/۱۲	۶۶/۰۸	۶۶/۰۸	۶۹/۲۸	۸۰/۱۹	۸۳/۳۴
	دی‌کلرومتان	۵۰/۴۰	۶۱/۷۴	۶۶/۵۴	۶۹/۶۳	۷۱/۴۶	۷۳/۶۳	۷۵/۴۳	۷۶/۹۸
	آبی	۵۲/۵۳	۶۱/۰۶	۶۲/۳۳	۶۳/۱۱	۷۱/۴۳	۷۴/۵۲	۷۹/۲۳	۸۰/۴۶
پوسته خیار دریایی	متانولی	۵۵/۲۹	۶۶/۰۸	۶۱/۵۴	۶۳/۶۵	۶۴/۳۷	۶۵/۳۸	۶۷/۶۸	۸۸/۶۵
	دی‌کلرومتان	۵۸/۳۶	۵۲/۷۹	۵۷/۸۶	۶۵/۴۵	۶۹/۲۸	۴۶/۹۱	۵۴/۲۲	۷۷/۱۸
	آبی	۴۷/۱۸	۵۰/۴۷	۶۸/۹۵	۶۸/۹۹	۶۱/۱۲	۶۹/۶۵	۷۰/۰۷	۷۱/۶۲
احشاء خیار دریایی	متانولی	۴۹/۲۴	۶۴/۷۶	۶۴/۷۹	۶۷/۵۳	۶۳/۶۵	۳۹/۷۷	۴۵/۷۹	۸۰/۰۶
	دی‌کلرومتان	۵۹/۴۱	۷۴/۴۸	۷۲/۰۲	۷۴/۷۴	۶۵/۷۱	۶۳/۵۱	۶۲/۱۳	۷۹/۵۵
	آبی	۵۰/۸۴	۶۳/۵۶	۶۰/۳۴	۶۸/۲۵	۶۱/۷۴	۵۷/۲۲	۴۸/۷۸	۴۹/۲۶
پوسته توتیای دریایی	متانولی	۴۸/۵۲	۴۴/۸۱	۵۴/۶۱	۵۷/۵۹	۵۵/۴۴	۵۰/۴۷	۶۰	۶۶/۸۰
	دی‌کلرومتان	۵۴/۴۴	۵۹/۵۲	۵۷/۸۳	۶۲/۹۹	۶۱/۷۲	۵۴/۶۱	۵۳/۴۹	۶۲/۸۳
	آبی	۶۶/۹۱	۶۶/۲۶	۷۰/۱۲	۶۶/۲۱	۶۸/۹۱	۷۲/۹۴	۶۳/۳۶	۶۱/۵۰
احشاء توتیا دریایی	متانولی	۶۱/۷۲	۶۹/۳۵	۷۰/۵۱	۷۱/۳۴	۷۵/۶۹	۷۶/۵	۷۷/۸۸	۸۷/۴۸
	دی‌کلرومتان	۶۳/۸	۶۴/۰۹	۷۳/۰۱	۷۸/۰۶	۷۹/۰۱	۷۹/۰۵	۸۰/۸۸	۸۱/۱۸
کنترل	گلوکانتیم	۶۰/۵۱	۶۴/۵۲	۶۵/۶۹	۷۰/۲۰	۷۱/۰۱	۷۳/۳۸	۸۰/۰۸	۹۵/۵
شاهد منفی	–	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۲: اثر دوزهای مختلف عصاره‌های پوسته و احشاء خیار دریایی، توتیای دریایی و ستاره دریایی استخراج شده با حلال‌های مختلف بر میزان رشد لیشمانیا ماژور

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات	آزمون F
عصاره	۵	۲/۷**	۶۰/۳۹۴
حلال	۲	۰/۱۲۶ns	۲/۸۲۵
دوز	۷	۰/۵۷۷**	۱۲/۹۱۶
عصاره * دوز	۳۵	۰/۰۶۶*	۱/۴۷۶
حلال * دوز	۱۴	۰/۰۶۴**	۱/۴۳۷
عصاره * حلال	۸	۰/۳۶۷**	۸/۲۱۹
عصاره * حلال * دوز	۵۶	۰/۰۶۹*	۱/۵۳۷
خطا	۲۷۲	۰/۰۴۵	
کل	۴۰۸		

ns تغییر غیرمعنی دار در سطح ۵ درصد، ** تغییر معنی دار در سطح ۵ درصد، * تغییر معنی دار در سطح ۱ درصد

خیار دریایی ارگانیسمی با ارزش غذایی و خواص درمانی بالا به شمار می‌آید. این جاندار به دلیل دارا بودن منابع غنی از پروتئین، مواد معدنی مختلف و انواع ویتامین‌ها در مقایسه با سایر غذاهای دریایی، در بسیاری از کشورها کاربرد تغذیه‌ای قابل توجهی دارد. تقریباً بیش از ۸۰ درصد بافت خیار دریایی از پروتئین تشکیل شده است. همچنین خواص بیولوژیکی متعددی نیز به این جاندار نسبت داده می‌شود و از طرفی، به علت داشتن موکوپلی‌ساکارید و کندروئیتین، قادر به مهار ویروس‌ها و متعادل نمودن پروستاگلاندین‌ها می‌باشد. در سال‌های اخیر از این ارگانیسم برای درمان HIV استفاده شده است(۱۳و۱۴). این جاندار در طب سنتی نیز برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. در تحقیق حاضر مشخص شد که بیشترین خاصیت ضدلیشمانیایی، مربوط به عصاره حاصل از پوسته خیار دریایی در مقایسه با احشاء آن و همچنین دو جاندار دریایی دیگر مطالعه شده می‌باشد که بسیار قابل توجه بوده و حاکی از پتانسیل بالای این ماده برای طراحی داروهایی با اثرات مؤثرتر و قوی‌تر می‌باشد. باستوس و همکاران نشان دادند که ترکیب کندروئیتین سولفات فوکوزیله دارای اثرات آنتی‌ترومبوز بر ضد پلاسمودیوم فالسیپاروم می‌باشد(۲۲). بافت این جاندار حاوی مقادیر مؤثری از ترکیب کوندروئیتین سولفات فوکوزیله می‌باشد. همچنین در پژوهش‌های جداگانه‌ای، خواص ضدآنتی‌باکتریال و آنتی ویرال آن به وسیله سانگ و ژانگ گزارش شده است(۲۳و۱۹). خصوصیات دیگری نظیر اثرات ضدسرطانی، تحریک سیستم ایمنی، التیام زخم و کاهش چربی خون نیز به این ماده نسبت داده شده است(۲۶-۲۳).

دو جاندار دریایی دیگر متعلق به شاخه خارپوستان که در این تحقیق از نظر خواص ضدلیشمانیال مورد ارزیابی قرار گرفت، توتیای دریایی(*Echinometra matheai*) متعلق به خانواده اکینوئیده و ستاره دریایی(*Ophiocoma scolopendrina*)

از راسته ستاره سانان می‌باشند. نتایج نشان داد که هر دو جاندار توتیای دریایی و ستاره دریایی دارای خواص آنتی‌لیشمانیال قابل توجهی می‌باشند. تاکنون بیش از ۸۰۰ گونه توتیای دریایی در جهان شناسایی شده و تنها حدود ۸۰ گونه از آن‌ها سمی می‌باشند. این موجودات در امتداد کف سنگی و صخره‌های مرجانی اقیانوس‌ها و دریاهای کم عمق و ژرف مناطق گرمسیری و معتدل و به ندرت در آب‌های مناطق سرد و قطبی یافت می‌شوند. در برخی نقاط، گونه‌های خاصی از توتیای دریایی نیز به عنوان یک غذای لوکس ارزش تغذیه‌ای دارد(۱۷)، ولی اهمیت بالای آن به دلیل داشتن پیگمان‌های پلی هیدروکسیلات نفتوکینون مانند اسپینوکروم و اکینوکروم با خواص آنتی باکتریال می‌باشد(۱۶). هم‌چنین پژوهش‌های مختلف، خواص متعدد ضدسرطانی، عروق‌زایی، سایتوتوکسیسیتی، ضد ایسکمی و آنتی‌باکتریال توتیای دریایی را با حضور ترکیباتی چون Triterpene diglycoside و Steroidal sulfate در بافت آن مرتبط دانسته‌اند(۲۹-۲۷).

بافت ستاره دریایی نیز حاوی ترکیب مؤثر Steroidal glycosides می‌باشد که در برخی پژوهش‌های صورت گرفته، خواص ارزشمند ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی و ضد التهاب آن مورد تأکید واقع شده است(۳۱و۳۰). این موجود دارای ۱۸۹۰ گونه مختلف بوده که برخی از گونه‌ها نقش اکولوژیکی برجسته‌ای در اکوسیستم دریا ایفاء می‌کنند و در موضوعات زیست شناسی تکاملی و آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار می‌گیرند(۱۵). در پروسه تهیه عصاره، به دلیل عدم امکان جداسازی پوسته از احشاء ستاره دریایی، عصاره آن به شکل کامل تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفت، لذا امکان بررسی اثر ضدلیشمانیایی دو بخش پوسته و احشاء آن به صورت جداگانه و طبق پروسه‌ای که برای خیار دریایی و توتیای دریایی انجام شده بود، فراهم نشد، ولی در هر حال، نتایج حاکی از اثری مؤثر در غلظت‌های بالاتر بود، هر چند که کمترین اثر کشندگی در میان این سه جاندار، مربوط به عصاره ستاره دریایی بوده است. علی‌رغم سلول‌های بدن انسانی که فاقد توانایی در تمایز و رشد مجدد می‌باشند، این جانداران قادر به ترمیم بخش‌های از دست رفته بدن و فرآیند کلونی شدن بوده و پتانسیل استفاده در ساخت داروهای انسانی را دارند.

در پروسه تهیه عصاره از ستاره دریایی، به دلیل عدم امکان جداسازی پوسته از احشاء جاندار، عصاره آن به شکل کامل تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفت و لذا امکان بررسی اثر ضدلیشمانیایی دو بخش پوسته و احشاء آن به صورت جداگانه و طبق پروسه‌ای که برای خیار دریایی و توتیای دریایی انجام شده بود، فراهم نشد.

با توجه به اثرات ضدلیشمانیال عصاره‌های هر سه جاندار دریایی و وجود ذخایر غنی از آن‌ها در خلیج فارس ایران، می‌توان با انجام یک سری پژوهش‌های تکمیلی در شرایط درون‌تنی و مشخص نمودن ترکیبات مؤثر این عصاره‌ها، گام‌های مؤثری

در راستای تولید دارویی مؤثر در کنترل و درمان بیماری لیشمانیوز جلدی که در کشورمان به عنوان یک بیماری آندمیک مطرح می‌باشد، برداشت.

نتیجه‌گیری

تمامی انواع عصاره‌های پوسته و احشاء سه جاندار دریایی مورد تحقیق دارای اثرات ضدلیشمانیایی بوده که در این میان، بیشترین میزان کشندگی مربوط به عصاره‌های متانولی پوسته خیار دریایی و احشاء توتیای دریایی می‌باشد. همچنین تمامی انواع عصاره‌ها، دارای سمیت بسیار پایینی برای سلول‌های میزبان بوده، لذا قابلیت تجاری سازی به صورت تهیه داروهای مؤثر را پس از انجام بررسی‌های تکمیلی به صورت درون تنی دارا می‌باشند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی با کد اخلاق IR.BPUMS.REC.1399.034 دانشگاه علوم پزشکی بوشهر می‌باشد. نویسندگان، مراتب سپاس و تشکر خود را از مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به دلیل تصویب و حمایت مالی این طرح اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1.Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. American Society for Microbiology Press; 2006.
2.World Health Organization, Regional Office for the Eastern Mediterranean(2006). Operational research in tropical and other communicable diseases: final report summaries 2003-2004: implemented during 2004-2006.
3.Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 4(366): 1561-77.
4.Azizi K, Davari B, Kalantari M, Fekri S. Gerbillid rodents fauna(Muridae: Gerbillinae) and detection of reservoir hosts(s) of zoonotic cutaneous leishmaniasis using a nested-PCR technique in Jask city in Hormozgan Province in 2008. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2011; 16: 66–76.
5.Fouladvand M, Barazesh A, Tahmasebi R. Evaluation of in vitro antileishmanial activity of curcumin and its derivatives "Gallium curcumin, Indium curcumin and Diacetylecurcumin". Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013; 17(24): 3306-8.
6.Nadim A, Javadian E, Mohebali M, Momeni A. Leishmania and leishmaniasis. Tehran University Nashr Center 2008: 20-32.
7.Azizi MH, Bahadori M, Dabiri S, Meymandi SS, Azizi F. A history of Leishmaniasis in Iran from 19th century onward. Arch Iranian Med 2016; 19(2): 153.
8.Momeni AZ Aminjavaheri M. Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. Int J Dermatol 1994; 33: 260-5.
9.Barazesh A, Motazedian MH, Sattarahmady N, Morowvat MH, Rashidi S. Preparation of Meglumine Antimonate loaded Albumin Nanoparticles and evaluation of its anti-leishmanial activity: An *in-vitro* assay. J Parasitic Dis 2018; 42(3): 416-22.
10.Fouladvand M, Barazesh A, Farokhzad F, Malekizadeh H, Sartavi K. Evaluation of invitro anti-*leishmanial* activity of some brown, green and red algae from the Persian Gulf. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15(6): 597-600.
11.Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). Antimicrob Agents Chemo 1998; 42(5): 1076-82.
12.Wijesekara I, Pangestuti R, Kim SK. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydrate Polymers 2011; 84(1): 14-21.
13.Shakouri A, Nematpour F. The study of economical justification of Sea Cucumber nurturing in Chabahar Bay Zone. J Fisheries 2013: 307-16.
14.Park SY, Lim HK, Lee S, Cho S K, Park S, Cho M. Biological effects of various solvent fractions derived from Jeju Island red sea cucumber (Stichopus japonicas). J Korean Soc Applied Biol Chem 2011; 54(5): 718-24.
15.Attaran-Fariman G, Panahlou N. Morphology assessment of star species Asteropecten (Asteroidea: Paxillosida) in coastal waters of Chabahar Bay (Oman Sea: Iran). J Marine Biol 2016; 7(4): 13-24.
16.Shankarlal S, Prabu K, Natarajan E. Antimicrobial and antioxidant activity of purple sea urchin shell (Salmacis virgulata L. Agassiz and Desor 1846). Am-Euras J Sci Res 2011; 6: 178-81.
17.Mohebbi G, Vazirizadeh A, Nabipour I. Sea urchin: toxinology, bioactive compounds and its treatment management. Iran South Med J 2016; 19(4): 704-35.
18.Zhang SY, Yi YH, Tang HF. Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber Holothuria fuscocinerea. Journal of Natural Products 2006; 69(10): 1492-5.
19.Zhang W, Lu Y, Xu B, Wu J, Zhang L, Gao M, Lei N. Acidic mucopolysaccharide from Holothuria leucospilota has antitumor effect by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion in vivo and in vitro. Cancer Biol Therap 2009; 8(15): 1489-99.
20.Melek FR, Tadros MM, Yousif F, Selim MA, Hassan MH. Screening of marine extracts for schistosomicidal activity in vitro. Isolation of the triterpene glycosides echinosides A and B with potential activity from the sea cucumbers Actinopyga echinites and Holothuria polii. Pharmaceutical Biology 2012; 50(4): 490-6.
21.Navvabi A, Homaei A, Khademvatan S, Ansari MH, Keshavarz M. In vitro study of the scolicidal effects of Echinometra mathaei spine and shell extracts on hydatid cyst protoscolices. Experimental Parasitology 2019; 203: 19-22.
22.Bastos MF, Albrecht L, Kozlowski EO, Lopes SC, Blanco YC, Carlos BC, et al. Fucosylated chondroitin sulfate inhibits Plasmodium falciparum cytoadhesion and merozoite invasion. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014; 58(4): 1862-71.

23.Song Y, Jin SJ, Cui LH, Ji XJ, Yang FG. Immunomodulatory effect of Stichopus japonicus acid mucopolysaccharide on experimental hepatocellular carcinoma in rats. Molecules 2013; 18(6): 7179-93.
24.Hu S, Chang Y, Wang J, Xue C, Shi D, Xu H, Wang Y. Fucosylated chondroitin sulfate from Acaudina molpadioides improves hyperglycemia via activation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle of insulin resistant mice. Food & Function 2013; 4(11): 1639-46.
25.Liu HH, Ko WC, Hu ML. Hypolipidemic effect of glycosaminoglycans from the sea cucumber Metriatyla scabra in rats fed a cholesterol-supplemented diet. J Agricul Food Chem 2002; 50(12): 3602-6.
26.Masre SF, Yip GW, Sirajudeen KNS, Ghazali FC. Wound healing activity of total sulfated glycosaminoglycan (GAG) from Stichopus vastus and Stichopus hermanni integumental tissue in rats. Int J Mol Med 2010; 6: 49-53.
27.Pandit R, Anil A, Lali A, Indap M. Evaluation of antiangiogenic activity through tubulin interaction of chloroform fraction of the feather star, *Lamprometra palmata palmata*. Indian J Marine Sci 2009; 38(1): 28-37.
29.Riguera R. Isolating bioactive compounds from marine organisms. J Marine Biotech 1997; 5: 187-93.
30.Uma B, Parvathavarthini R. Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, Temnopleurus alexandri (Bell, 1884). Int J PharmTech Res 2010; 2(3): 1677-80.
31.Wang W, Li F, Alam N, Liu Y, Hong J, Lee CK, Jung JH. New Saponins from the Starfish Certonardoa s emiregularis. J Nat Product 2002; 65(11): 1649-56.
32.Wang W, Hong J, Lee CO, Im KS, Choi JS, Jung JH. Cytotoxic sterols and saponins from the starfish certonardoa s emiregularis. J Nat Product 2004; 67(4): 584-91.

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

Original Article

Evaluation of Anti-Leishmanial Effect of Three Native Marine Animals Extract of Persian Gulf in Vitro Condition

Fooladvand MA[1]*, Borazjani M[2], Khorami S[1], Shariat A[2], Barazesh A[3]

[1]Department of Microbiology and Parasitology, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran, [2]Departments of Microbiology, Islamic Azad University, Kazerun Unit, Kazerun, [3]Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

Received: 06 Jun 2020 Accepted: 04 Aug 2020

Abstract

Background & aim*:* Treatment of leishmaniasis has been identified as the seventh research priority by WHO. Despite the many studies that have been conducted in this regard, there is still no specific treatment for it. Therefore, the side effects of conventional drugs and the emergence of parasite resistance have made their use an important challenge. Recently, extensive studies have been conducted on extracts and various plant compounds against the parasite *Leishmania*, and even the use of drugs with marine sources has been considered due to the side effects and lower cost and greater adaptation of patients to these drugs. The aim of the present study was to determine and evaluate the anti-leishmanial effect of three native marine animals' extract of Persian Gulf in vitro condition.

Methods: In this experimental study conducted in 2017-2018, all three organisms were collected from the coastal waters of Bushehr province. After separation of crust and viscera, they were extracted by percolation method and using different solvents. The anti-leishmanial effects and the degree of cytotoxicity of these products were evaluated on the promastigote form of *Leishmania major* and vero cells, based on the biochemical test of MTT assay respectively. The collected data were analyzed using LSD statistical test at the statistical level of one percent.

Results: Statistical analysis indicated that the extract type and the concentrations used (dose) had a very significant effect. Correspondingly, the dual interactions effect of extract and dose, extract and solvent, as well as the triple interaction of extract, solvent and dose were significant on the inhibitory rate. The highest anti-leishmanial activity was related to methanolic extracts of *Holothuria parva*'s shell (88.65%) and *Echinometra matheai*'s viscera (87.48%) at 800µg/ml concentrations, and the lowest activity was obtained in aqueous extract of *Ophiocoma scolopendrina* (43.01%) at 20µg/ml concentration.

Conclusion: All types of shell extracts and viscera of the three studied marine organisms have anti-leishmanial effects, among which, the highest lethality was related to methanolic extracts of sea cucumber shell and sea urchin viscera. Moreover, all types of extracts had very low toxicity to host cells and therefore had the ability to be commercialized in the form of effective drugs after additional in vitro studies.

Keywords: Anti-leishmanial Activity, *Holothuria parva, Echinometra matheai, Ophiocoma scolopendrina*.

***Corresponding author: Fooladvand MA,** Department of Microbiology and Parasitology, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.
Email: mfooladvand39@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Fooladvand MA, Borazjani M, Khorami S, Shariat A, Barazesh A. Evaluation of Anti-Leishmanial Effect of Three Native Marine Animals Extract of Persian Gulf in Vitro Condition. Armaghane-danesh 2020; 25(4): 438-450.