دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۲، صفحه ۲۹۰-۲۷۶ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.114713.2081
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.276.94.2.1576.1610

بررسی اثر عصاره آبی و الکلی گیاه مورد (*Myrtus communis* L.) بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی در شرایط برون‌تنی

هدی میرزاییان[۱]، فاطمه غفاری‌فر[۲*]، جاوید صدرایی[۳] و امیر عبدلی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

۳- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۷

چکیده

توکسوپلاسموز یکی از شایعترین عفونت‌های انگلی زئونوز در جهان می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی تأثیرات ضدتوکسوپلاسمایی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مورد (*Myrtus communis* L.) در شرایط in vitro بوده است. در این تحقیق تأثیر ضدتوکسوپلاسمایی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مورد بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی و تأثیر آن بر مهار تکثیر داخل سلولی انگل در سلول‌های ماکروفاژ موشی J774 با تست MTT و روش مستقیم بررسی گردید. نتایج نشان داد که عصاره آبی گیاه مورد با غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ µg/ml بالاترین درصد کشندگی (۸۷٪ و ۸۱٪) را بر روی تاکی‌زوئیت‌های انگل داشته است، در حالیکه اثر کشندگی آنها بر روی سلول‌های ماکروفاژ غیرآلوده به انگل کمتر از بقیه رقّت‌ها بود. این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و الکلی مورد اثرهای قابل توجهی بر مهار تکثیر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما و تکثیر داخل سلولی انگل دارد.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، توکسوپلاسموز، عصاره الکلی، عصاره آبی، گیاه مورد سبز.

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی (*Toxoplasma gondii*)، تک‌یاخته درون سلولی با شیوع جهانی است که بسیاری از گونه‌های مهره‌داران خونگرم ازجمله انسان را آلوده می‌نماید. توکسوپلاسموز ازجمله شایعترین عفونت‌های زئونوز می باشد و میزان شیوع این انگل در جوامع مختلف بسیار متغیر بوده و بین ۸۰-۲۰٪ در انسان گزارش شده است. توکسوپلاسما گوندی به سه شکل در میزبانان مشاهده می‌شود: اشکال تاکی‌زوئیت، کیست نسجی (برادی زوئیت) و اووسیست. تاکی‌زوئیت‌ها معمولاً در مرحله حاد بیماری در میزبان اصلی و واسط دیده می‌شود. کیست‌های نسجی که حاوی برادی زوئیت‌ها می‌باشند معمولاً در مرحله مزمن عفونت و در عضلات و مغز میزبان اصلی و واسط تشکیل می‌شوند، این مرحله بسیار مقاوم بوده و تا چندین سال قابلیت زنده ماندن را دارند. اووسیست‌ها فقط در روده میزبان اصلی (گربه و گربه‌سانان) تشکیل شده و با مدفوع

دفع می‌گردند. اووسیست در موقع دفع غیر آلوده‌کننده است اما وقتی در خارج از بدن میزبان در شرایط مناسب قرار گیرد اسپوروگونی انجام شده و آلوده‌کننده می شود. سیر تکاملی توکسوپلاسما در دو میزبان یکی نهایی (گربه و گربه‌سانان) و دیگری واسط (بیشتر مهره‌داران خونگرم ازجمله انسان) انجام می‌شود. یکی از راه‌های اصلی آلودگی، خوردن گوشت خام یا نیم‌پز حاوی کیست نسجی می‌باشد. همچنین خوردن غذا و آب آلوده به اووسیست‌های انگل از راه‌های دیگر آلودگی می‌باشد. یکی از خطرناک‌ترین راه‌های آلودگی، انتقال مادرزادی انگل از طریق جفت به جنین می باشد، که با عوارض خطرناکی برای مادر و جنین مانند سقط و مرده‌زایی و یا عقب افتادگی ذهنی در فرزند همراه است. انتقال انگل از طریق شیر، تخم‌مرغ، خون و فرآورده‌های خونی نیز گزارش شده است (Montoya & Liesenfeld, 2004).

عفونت در انسان اغلب بدون علامت بوده و یا با نشانه های خفیف و خود محدودشونده است. توکسوپلاسموز اکتسابی در افراد با سیستم ایمنی طبیعی تقریباً در ۹۰-۸۰٪ موارد بالغین بدون علامت می‌باشد. شایعترین علائم توکسوپلاسموز اکتسابی لنفادنوپاتی می‌باشد که اغلب غدد لنفاوی گردنی و زیر استخوان پس‌سری بزرگ می‌شود (Dalimi & Abdoli, 2012). جنین زنان بارداری که عفونت را برای اولین بار کسب می‌کنند ممکن است سقط شود و یا با عوارض مغزی شدید و عقب افتادگی به دنیا بیاید. توکسوپلاسموز چشمی اکثراً به‌دنبال عفونت‌های مادرزادی در دومین یا سومین دهه عمر و به‌ندرت پس از توکسوپلاسموز اکتسابی حاد بروز می نماید. توکسوپلاسموز شایعترین علت اثبات شده کوریورتینیت در دنیا می باشد. ضایعات بیشتر مربوط به بخش خلفی چشم، شبکیه و مشیمیه می‌باشد. تاری دید، درد چشم، ترس از نور در اثر کوریورتینیت فعال دیده می شود. همچنین در افردی که سیستم ایمنی آنها به‌نحوی سرکوب شده است، مانند مبتلایان به ایدز، دریافت‌کنندگان عضو پیوندی و بیماران سرطانی عوارض خطرناکی داشته و می تواند منجر به مرگ شود. در مبتلایان به ایدز فعال شدن عفونت نهفته اهمیت زیادی دارد، زیرا بیشتر آنها دچار آنسفالیت توکسوپلاسمایی کشنده می شوند. در بیشتر موارد زمانی که $TCD4^+$ به زیر ۱۰۰ می رسد آنسفالیت رخ می دهد. تب، کوریورتینیت، التهاب عضلات ارادی، پنومونی، هپاتواسپلنومگالی و میوکاردیت از علائم دیگر این بیماران می‌باشد (Montoya & Liesenfeld, 2004).

شکل‌های بالینی لنفادنوپاتیک توکسوپلاسموز اکتسابی اغلب نیاز به درمان ندارند، مگر اینکه تب و شواهدی از گرفتاری سایر ارگان‌های بدن وجود داشته باشد (Montoya & Liesenfeld, 2004). داروهایی که به‌طور معمول استفاده می شوند روی شکل فعال انگل (تاکی‌زوئیت‌ها) مؤثرند ولی بر روی کیست‌های نسجی تأثیر کمی دارند (Neville *et al*., 2015). درمان انتخابی توکسوپلاسموز ترکیب سینرژیستیک پیریمتامین و سولفادیازین می‌باشد که این داروها بازدارنده متابولیسم فولات هستند و مانع سنتز اسید فولیک می‌شوند (Montoya & Liesenfeld, 2004). در موارد آنسفالیت توکسوپلاسمایی به‌ویژه در بیماران دچار ایدز ترکیب دارویی پیریمتامین- سولفادیازین به همراه آزیترومایسین، همچنین ترکیب‌های دارویی تریمتوپریم-سولفامتاکسازول و پیریمتامین-کلیندامایسین نتایج مؤثری در درمان بیماران داشته است (Yan *et al*., 2013؛ Wei *et al*., 2015). درمان توکسوپلاسموز در زنان باردار وابسته به زمان آلوده شدن مادر می‌باشد. اگر مادر قبل از هفته ۱۸ بارداری آلوده شده باشد درمان انتخابی اسپیرامایسین می‌باشد، چون پیریمتامین تراتوژنیک است و در ۲۰ هفته اول بارداری منع مصرف دارد (McLeod *et al*., 2014؛ Avci *et al*., 2015). اما در موارد حاد توکسوپلاسموز مادرزادی و همچنین اگر آلودگی بعد از هفته ۱۸ بارداری باشد ترکیب دارویی پیریمتامین- سولفادیازین به همراه اسید فولیک توصیه شده است (McLeod *et al*., 2014). البته تحقیقات جدیدتر حکایت از آن دارد که ترکیب دارویی اسپیرامایسین-کوتریموکسازول در مقایسه با اسپیرامایسین نتایج بسیار بهتری در درمان توکسوپلاسموز مادرزادی داشته است و خطر انتقال انگل از

مادر بـه جنـین را بـه‌طـور معنـی‌داری کـاهش داده اسـت (Valentini *et al*., 2015). در مـوارد توکسوپلاسـموز چشـمی، ترکیـب دارویـی پیریمتـامین- سـولفادیازین- کورتیکواستروئید به‌عنوان درمان کلاسـیک توکسوپلاسـموز شناخته می‌شود و در بسیاری از مراکز درمـانی رایـج اسـت (Maenz *et al*., 2014 ؛Cerqueira Lima *et al*., 2015). همچنین ترکیب های دارویی تریمتوپریم-سولفامتاکسـازول و داروهای آزیترومایسین، کلیندامایسین و اسپیرامایسین بـرای درمان توکسوپلاسموز چشمی بسیار مؤثر شـناخته شـده‌انـد (Maenz *et al*., 2014 ؛Cerqueira Lima *et al*., 2015).

در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و ایدز، بهترین راه بـرای پیشـگیری از ابـتلا بـه توکسوپلاسـموز پروفیلاکسـی دارویـی مـی‌باشـد (Yan *et al*., 2013). در ایـن دسـته از بیماران فعال شـدن دوبـاره عفونـت نهفتـه منجـر بـه بـروز توکسوپلاسموز شده که در بیشتر موارد با علائم حـاد بـروز مـی‌نمایـد (Montoya & Liesenfeld, 2004). در ایـن بیماران معمولاً به‌منظور پیشگیری از ابـتلا بـه عفونـت‌هـای فرصـت‌طلـب ماننـد پنوموسیسـتیس ترکیـب دارویـی تریمتـوپریم-سولفامتاکسـازول در رژیـم درمـانی گنجانـده مـی‌شـود کـه تـأثیر زیـادی در پیشـگیری از ابـتلا بـه توکسوپلاسموز نیز دارد (Yan *et al*., 2013). همچنین رژیم دارویـی Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) که به‌منظور بهبود سیستم ایمنی و پیشـگیری از عفونت‌های فرصت‌طلب در بیماران مبـتلا بـه ایـدز تجـویز مـی‌گـردد نقـش بسـزایی در پیشـگیری از ابـتلا بـه توکسوپلاسـموز دارد (Maschke *et al*., 2000؛ Vidal & Oliveira, 2013).

گیـاه مـورد سـبز (*Myrtus communis*)، یـک گیـاه درختچه‌ای بومی جنوب اروپا و آفریقای شـمالی مـی‌باشـد (Sumbul *et al*., 2011). مهمترین ترکیب‌های مورد، رایحـه (اسانس) آن می‌باشد کـه حـاوی سـینئول، میرتنـول، پیـنن، ژرانیول، لینالول و کامفن است. همچنین ترکیب هـای آسـیل فلوروگلوسینول ها در مورد کشـف شـده اسـت کـه مسـئول خاصیت ضد تورم آن است. در قسمت‌های مختلف، ازجملـه برگ، میوه و گل مورد، تانن، اسانس و مـواد رزینـی وجـود دارد که خاصیت قوی قـابض آن مربـوط بـه تـانن هاسـت. دانه‌های موجود در میوه حاوی ترکیب‌های روغنـی ازجملـه اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک و پالمیتیک هسـتند. میـوه گیاه، غیر از مواد مذکور، حـاوی قنـدهای مختلـف و اسـید مالیک و اسید سیتریک مـی‌باشـد (Alipour *et al*., 2014؛ Baharvand-Ahmadi *et al*., 2015؛ Mimica-Dukić *et al*., 2010). گیاه مورد اثر ضدعفونی‌کننـده دارد و از آن در مصارف داخلی و خارجی می توان اسـتفاده کـرد. همچنـین مقوی معده و نیرودهنده است و در رفع بیماری های دسـتگاه تنفس و مجاری ادرار بکار می رود. در طـب سـنتی از ایـن گیاه برای تقویت معده می تـوان قبـل از هـر وعـده غـذایی اسـتفاده کـرد (Alipour *et al*., 2014؛ Sumbul *et al*., 2011). غرغره جوشانده آن در ضـدعفونی و رفـع تحریـک مخاط دهان مؤثر است. همچنین در رفع بیماری‌های جلـدی و مواقعی که به‌علت بروز دانه های جلدی پوسته های کوچک و سفیدرنگ در پوست ظاهر می شود می توان اسـتفاده کـرد. مـورد بـه‌صـورت موضـعی در درمـان تبخـال، بـه‌عنـوان آنتی‌سپتیک و در درمان التهاب مخاط بینی استفاده می‌گـردد (Mimica-Dukić *et al*., 2010). تاکنون مطالعات بسـیاری درباره خواص ضد میکروبی و ضد قارچی ایـن گیـاه انجـام شده است (Alipour *et al*., 2014؛ Baharvand-Ahmadi *et al*., 2015). به تازگی موادی با خاصیت آنتی‌بیـوتیکی از این گیاه استخراج شده است. مواد فعال مورد به‌طـور سـریع جذب می شود و ظـرف ۱۵ دقیقـه ادرار بـوی مخصـوص و رنگـی بـنفش پیـدا مـی‌کنـد (Alipour *et al*., 2014؛ Baharvand-Ahmadi *et al*., 2015؛ Sumbul *et al*., 2011). در چندین مطالعه نیز خواص ضدانگلی عصاره ایـن گیاه مشخص شده اسـت. بـا ایـن حـال تـاکنون مطالعـه‌ای به‌منظور بررسی تأثیر گیـاه مـورد بـر انگـل توکسوپلاسـما گوندی انجام نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی گیاه مـورد بـر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی بوده است.

مواد و روش‌ها

تکثیر توکسوپلاسما گوندی

در این مطالعه از سویه RH توکسوپلاسما گوندی استفاده گردید. تعداد تقریبی ۱۰۰۰۰ تاکی‌زوئیت انگل را به‌صورت داخل صفاقی به تعدادی موش سوری تزریق نموده و پس از گذشت ۵-۴ روز و قبل از مرگ موش‌ها، مایع صفاقی با تزریق سرم فیزیولوژی به داخل صفاق تخلیه شدند. از آنجایی که تاکی‌زوئیت‌ها درون ماکروفاژهای صفاقی موش رشد می‌کنند، به‌منظور خروج تاکی‌زوئیت‌ها از ماکروفاژ بهتر است مایع صفاقی موش‌های آلوده چندین بار از سرنگ‌هایی با سر سوزن ریز عبور داده شوند.

آماده‌سازی عصاره آبی و الکلی گیاه مورد

عصاره آبی

گیاه مورد سبز از منابع معتبر خریداری و زیر نظر کارشناس هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تأیید و کد هرباریومی آن ۸۰۲۴ دریافت شد. ابتدا مقدار ۵۰ گرم از گیاه مورد سبز را کاملاً خورد کرده، به یک بشر ۱۰۰۰CC منتقل کرده و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی آن ریخته شد. آنگاه به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه آن را روی حرارت بسیار ملایم گذاشته و بعد از جوشیدن و خنک شدن با کاغذ صافی صاف گردید. مایع صاف شده به مقدار ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر درون لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و در فریزر ۷۰- سانتیگراد قرار داده شد. سپس لوله‌ها از فریزر خارج و به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار داده شدند و درنهایت عصاره خشک پودری حاصل شد. عصاره خشک حاصل تا زمان هر بار استفاده در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

عصاره الکلی

ابتدا مقدار ۵۰ گرم از گیاه مورد سبز را کاملاً خُرد کرده، به یک بشر ۱۰۰۰CC منتقل کرده و ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۵-۸۰٪ به آن افزوده شد. سپس به مدت ۶-۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده و بعد از آن به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. تمامی محلول به‌وسیله گاز استریل صاف گردید. محلول را به مقدار ۳۵ میلی‌لیتر در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و به‌وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۵۰۰۰RPM به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن محلول روی لوله‌ها را به بشر دیگری منتقل کرده و به سرعت در دستگاه تبخیر گذاشته تا الکل اضافی از محلول خارج شود. عصاره باقیمانده را به مقدار ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر درون لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در فریزر ۷۰- قرارداده، سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه لیوفیلیزه قرار داده شدند و در نهایت عصاره خشک پودری حاصل شد و عصاره خشک حاصل تا زمان هر بار استفاده در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

تهیه رقت‌های مختلف عصاره آبی و الکلی گیاه مورد

ابتدا با حل کردن ۸ میلی‌گرم پودر خشک هر یک از عصاره‌های آبی و الکلی گیاه به‌صورت جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر ۱۰ محلول PBS، عصاره استوک تهیه کرده، سپس از محلول استوک، رقّت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ (μg/ml) تهیه شد.

تهیه سولفادیازین به‌عنوان داروی کنترل

ماده مؤثره سولفادیازین به‌صورت پودر خشک از شرکت سبحان دارو خریداری شد. محلول سولفادیازین با غلظت ۸۰۰μg/ml (به‌عنوان محلول استوک) با حل کردن ۸ میلی‌گرم پودر سولفادیازین در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۲۰٪ دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) تهیه و بعد از عبور از فیلتر ۰/۲۲μ در فریزر ۲۰- نگهداری شد. غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ (μg/ml) با رقیق کردن محلول استوک تهیه شده و در دمای ۴°C نگهداری شدند.

کشت سویه استاندارد سلول ماکروفاژ (J774)

سلول ماکروفاژ از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید و در فلاسک کشت حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 سرم‌دار کشت داده شد. بعد از پر شدن کف فلاسک سلول‌ها را با ضربه از کف فلاسک جدا کرده و پیپتاژ کامل شد. سپس ۱ به ۳ درون فلاسک‌های جدید پاساژ داده شد.

درمان سلول‌های ماکروفاژ آلوده به توکسوپلاسما گوندی و محاسبه IC_{50}

لامل‌های گرد سایز ۱۸×۱۸mm با فور استریل شده و بعد از خنک شدن زیر هود و در شرایط استریل درون چاهک‌های پلیت قرار داده شد. بعد از کشت سلول ماکروفاژ و کندن آن از کف فلاسک، سلول‌ها کاملاً پیپتاژ شدند تا از هم جدا شوند. محتویات فلاسک را به فالکون انتقال داده و با دور ۱۵۰۰RPM سانتریفیوژ گردید. بعد از شمارش، مقدار 1×10^5 سلول ماکروفاژ به هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای به‌صورت سه‌تایی ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. تعداد 2×10^5 تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندی به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت تا انگل بتواند به سلول ماکروفاژ متصل شود. سپس مایع رویی را خالی کرده و عصاره الکلی، آبی و سولفادیازین هر یک با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ (µg/ml) به هر چاهک اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. در مرحله بعد، محیط کشت رویی را دور ریخته و فیکساسیون با متانول انجام شد و بعد از خشک شدن در هوای آزمایشگاه، لامل‌ها از درون چاهک‌ها خارج شد و با رنگ گیمسا (با رقّت ۱/۱۰ در آب) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. تعداد تکثیر تاکی‌زوئیت‌های درون سلول و تعداد سلول‌های آلوده در صد سلول با فرمول زیر محاسبه گردید. مقدار IC_{50} بعد از ۳ و ۲۴ ساعت به‌وسیله نرم‌افزار Graphpad prism 5 محاسبه گردید.

$$\text{تعداد تکثیر انگل درون سلول آلوده} = \frac{\text{تعداد سلول های انگل شمرده شده درون سلول}}{\text{تعداد } \mathbf{100} \text{ سلول آلوده}}$$

ارزیابی میزان بقاء تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما به روش MTT

آزمون MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) یک روش نورسنجی است که به‌وسیله آن می‌توان پاسخ سلول‌های مختلف را به فاکتورهای خارجی ازجمله فاکتورهای رشد، داروهای سایتوتوکسیک و سایر عوامل شیمیایی ارزیابی نمود. MTT قادر به عبور از غشاء سلول‌ها می‌باشد. پس از ورود MTT به سلول‌های سالم، آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی حلقه تترازولیوم آن را می‌شکند و به فورمازان نامحلول و آبی رنگ تبدیل می‌شود. در حالیکه سلول‌های مرده از این عمل ناتوان هستند. با بدست آوردن جذب نوری نمونه‌ها می‌توان از طریق فرمول زیر درصد بقای سلول را محاسبه کرد. پودر MTT از شرکت سیگما خریداری شد. ۵ میلی‌گرم پودر MTT را در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS حل کرده و پس از حل شدن کامل، محلول را با فیلتر ۰/۲۲µ فیلتر می‌کنیم تا کاملاً استریل شده و ذرات نامحلول موجود در آن حذف شود. محلول باید قبل از آزمایش تهیه شده و به‌صورت تازه استفاده شود و تمام مراحل ساخت و استریل کردن محلول در تاریکی انجام می‌شود و در نهایت رنگ تهیه شده باید دور از نور و دمای ۲۰- نگهداری شود.

به‌منظور بررسی اثر ماده MTT بر روی سلول‌های ماکروفاژ J774 و بدست آوردن غلظت مناسب سلولی برای آزمایش‌های بعدی، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف

در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. بدین‌منظور سلول های با غلظت‌هایی در محدوده ۱۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت پلیت را از انکوباتور خارج و به هر چاهک ۱۰λ محلول MTT و ۹۰λ محیط کشت RPMI-1640 سرم‌دار حاوی ۱۰٪FBS اضافه کرده و بعد به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۳۷C انکوبه شدند. سپس محیط رویی هر چاهک را به آرامی خارج کرده و به هر چاهک ۱۰۰λ دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه نموده و بعد از چندین بار پیپتاژ کردن هر چاهک به‌منظور حل شدن بلورهای فورمازان، جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۹۰-۵۴۰ نانومتر خوانده شد. بهترین غلظت برای کشت سلول برای انجام آزمایش‌ها، تداد ۲۰۰۰۰ تا۳۵۰۰۰ سلول بدست آمد.

در مرحله بعد تعداد ۳×۱۰۴ سلول ماکروفاژ آلوده با انگل درون پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به صورت سه‌تایی ریخته شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 سرم‌دار با ۱۰٪ سرم FBS ریخته شده و درون انکوباتور، در ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت رویی دور ریخته شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سرم‌دار جدید و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره الکلی و آبی هر یک با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ (µg/ml) و داروی سولفادیازین با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ (µg/ml) ریخته شده و به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت مایع رویی خالی شده و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT و ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت سرم‌دار اضافه کرده و به‌مدت ۵-۳ ساعت انکوبه می‌شود (محلول MTT در تاریکی اضافه شده و دور پلیت با فویل پوشانده شده و درون انکوباتور قرار می‌گیرد). مایع رویی دوباره خالی شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک محلول DMSO اضافه می‌شود و ۱۵ دقیقه در همان حال باقی می‌ماند. در مرحله آخر، بعد از چندبار پیپتاژ کردن جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری

نتایج حاصل از آزمایش های مختلف به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean±SD) بیان گردید. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون Anova مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین بدست‌آمده از گروه کنترل بدون درمان در این آزمایش ۴/۳۶± ۱۵۸ است. برای عصاره آبی IC_{50}=۵۶/۴µg/ml، برای عصاره الکلی IC_{50}=۴۷/۲µg/ml و برای سولفادیازین IC_{50}=۱۶/۵µg/ml محاسبه شد. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

میانگین و انحراف معیار تأثیر داروی سولفادیازین و عصاره آبی و الکلی مورد بر تعداد ماکروفاژها بعد از ۲۴ ساعت

بر این اساس میانگین بدست‌آمده از کنترل ماکروفاژ ۸۶/۷±۲/۲۴ است. برای عصاره آبی IC_{50}=۵۶/۴µg/ml، برای عصاره الکلی IC_{50}=۴۷/۲µg/ml و برای سولفادیازین IC_{50}=۱۶/۵µg/ml محاسبه شد. نتایج در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- تأثیر سولفادیازین و عصاره آبی و الکلی مورد بر تعداد تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی $۱۰^{۴}$× پس از زمان ۳ ساعت

غلظت (mg/ml)	دارو/عصاره		
	سولفادیازین	عصاره الکلی	عصاره آبی
۴۰۰	۹±۲	۷۷/۶۶±۲	۵۲/۳۳±۲
۲۰۰	۱۷/۳۳±۲	۵۴/۳۳±۲	۴۹±۲
۱۰۰	۱۹/۶۵±۲	۴۳/۶۵±۲	۴۱/۶۶±۲
۵۰	۲۲±۲	۳۵/۶۴±۲	۳۵±۲
۲۵	۲۴/۳۳±۲	۳۰±۲	۲۷/۶۶±۲
۱۲/۵	۲۴±۲	۲۳/۶۷±۲	۲۲/۶۶±۲

جدول ۲- تأثیر سولفادیازین و عصاره آبی و الکلی مورد بر ماکروفاژهای J774

غلظت (mg/ml)	دارو/عصاره		
	سولفادیازین	عصاره الکلی	عصاره آبی
۴۰۰	۳۷/۳۳±۲	۳۷±۲	۴۰/۳۳±۲
۲۰۰	۳۱±۲	۳۰±۲	۲۷/۶۶±۲
۱۰۰	۲۸/۶۶±۲	۲۶/۶۵±۲	۲۱/۳۳±۲
۵۰	۲۵/۳۳±۲	۲۱/۶۶±۲	۱۹±۲
۲۵	۱۸/۶۴±۲	۱۸±۲	۱۶/۳۲±۲
۱۲/۵	۱۷±۲	۱۷±۲	۱۴/۹۶۵±۲

جدول ۳- میزان IC_{50} به سلول‌های ماکروفاژ آلوده به توکسوپلاسما گوندی تحت درمان با عصاره آبی و الکلی گیاه مورد و سولفادیازین در زمان ۲۴ ساعت

IC_{50}	عصاره آبی	۵۶/۴μg/ml
	عصاره الکلی	۴۷/۲μg/ml
	سولفادیازین	۱۶/۵μg/ml

میزان IC_{50} بدست‌آمده از شمارش سلول‌های ماکروفاژ آلوده به توکسوپلاسما گوندی تحت درمان با عصاره آبی و الکلی گیاه مورد و سولفادیازین با غلظت‌های مذکور در جدول ۳ ذکر گردید.

براساس نتایج ذکر شده در جدول ۴، بیشترین تأثیر بر ماکروفاژ آلوده به انگل در غلظت ۴۰۰μg/ml عصاره آبی مورد دیده شد.

براساس نتایج ذکر شده در جدول ۵، بیشترین تأثیر بر ماکروفاژ آلوده به انگل در غلظت ۴۰۰μg/ml عصاره الکلی دیده شد.

براساس نتایج ذکر شده در جدول ۶ بیشترین تأثیر دارو بر ماکروفاژ آلوده به انگل در غلظت ۴۰۰μg/ml سولفادیازین (بیشترین میزان آلودگی) دیده شد.

براساس نتایج ذکر شده در جدول ۷، بیشترین تأثیر عصاره آبی، الکلی و داروی سولفادیازین بر ممانعت از تکثیر انگل مربوط به غلظت ۴۰۰μg/ml و کمترین تأثیر آن مربوط به غلظت ۱۲/۵μg/ml بود.

نتایج MTT

برای بررسی تأثیر سمّیت سلولی، داروی سولفادیازین و عصاره‌های آبی و الکلی مورد با غلظت‌های به‌ترتیب ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ (μg/ml) تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت نتایج زیر از آزمایش MTT حاصل شد.

جدول ۴- میانگین درصد آلودگی سلول ماکروفاژ آلوده به توکسوپلاسما پس از مواجهه با غلظت‌های ۱۲/۵-۴۰۰μg/ml عصاره آبی مورد در مدت زمان ۲۴ ساعت

غلظت	کنترل	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
درصد آلودگی	۹۶/۱±۱	۹۳/۲±۱/۳	۹۰±۲/۱	۸۰/۶±۱/۱	۷۸±۱/۵	۷۷/۴±۰/۹۵	۷۳/۵±۱/۳

جدول ۵- میانگین درصد آلودگی سلول ماکروفاژ به توکسوپلاسما پس از مواجهه با غلظت‌های ۱۲/۵-۴۰۰μg/ml عصاره الکلی مورد در مدت زمان ۲۴ ساعت

غلظت	کنترل	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
درصد آلودگی	۹۶/۱±۱	٪۹۲±۲/۱۶	٪۸۹±۱/۲۳	٪۸۱±۲/۰۵	٪۷۱±۱/۰۲	٪۷۶±۱/۹۵	٪۷۰±۱/۷۲

جدول ۶- میانگین درصد آلودگی سلول ماکروفاژ به توکسوپلاسما پس از مواجهه با غلظت‌های ۱۲/۵-۴۰۰μg/ml داروی سولفادیازین در مدت زمان ۲۴ ساعت

غلظت	زمان	کنترل	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
درصد آلودگی	۲۴ ساعت	۹۶/۱±۱	٪۸۴±۰/۱۵	٪۸۱±۰/۱۶	٪۷۹±۲/۱	٪۶۳±۱/۲۱	٪۵۶±۰/۹۵	٪۴۸±۱/۷۸

جدول ۷- میانگین تکثیر داخل سلولی توکسوپلاسما در ماکروفاژ بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تأثیر عصاره آبی، الکلی و داروی سولفادیازین

عصاره	غلظت (µg/ml)						
	کنترل	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
عصاره آبی	۳۶/۶±۰/۹	۲۵/۶±۰/۸	۱۹/۱±۱/۱	۱۶/۴۵±۲/۱	۱۶/۹۲±۱/۱۵	۱۵/۸۲±۱/۴۵	۹/۴±۰/۷۸
عصاره الکلی	۳۶/۶±۰/۹	۲۴/۸±۱/۹	۱۸/۵±۱/۱	۱۵/۹±۰/۸۷	۱۴/۹±۱/۴۶	۱۵/۴±۱/۵۰	۸/۱±۲/۱
سولفادیازین	۳۶/۶±۰/۹	۱۷/۹±۱/۵	۱۴/۸±۱/۲	۹/۷۴±۰/۷۹	۷/۶۴±۱/۱۵	۴/۹۲±۱/۲۵	۳/۴۸±۰/۹۸

جدول ۸- درصد **Viability** حاصل از نتایج **MTT** بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی

غلظت دارو (**mg/ml**)	عصاره		
	عصاره آبی	عصاره الکلی	سولفادیازین
۱۲/۵	۱۳	۴۰/۶	۱۲
۲۵	۱۹	۴۰/۶	۱۱
۵۰	۲۲	۴۰/۶	۱۱
۱۰۰	۳۶	۴۳/۷	۹
۲۰۰	۶۳	۶۳	۸
۴۰۰	۸۴	۹۳/۷	۵

جدول ۹- درصد سیتوتوکسیسیتی حاصل از نتایج **MTT** بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی

غلظت دارو (**mg/ml**)	عصاره		
	عصاره آبی	عصاره الکلی	سولفادیازین
۱۲/۵	۸۷	۵۹/۴	۸۸
۲۵	۸۱	۵۹/۴	۸۹
۵۰	۷۸	۵۹/۴	۸۹
۱۰۰	۶۴	۵۶/۳	۹۱
۲۰۰	۳۷	۳۷/۰	۹۲
۴۰۰	۱۶	۶/۳۰	۹۵

غلظت‌های مختلف سولفادیازین بیشترین اثر کشندگی را بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما دارند و بعد از آن غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ (μg/ml) عصاره آبی از بیشترین تأثیر کشندگی بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما (به‌ترتیب ۸۷٪، ۸۱٪ و ۷۸٪) برخوردارند. کمترین اثر کشندگی مربوط به غلظت ۴۰۰μg/ml عصاره‌های آبی و الکلی مورد (به‌ترتیب ۱۶٪ و ۶/۳٪) می‌باشد (جدول‌های ۸ و ۹).

نتایج حاصل از آزمون سمّیت غلظت‌های مختلف سولفادیازین و عصاره‌های آبی و الکلی مورد بر روی سلول ماکروفاژ J774

سولفادیازین با غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰μg/ml پس از گذشت ۲۴ ساعت بیشترین اثر کشندگی (به‌ترتیب ۸۸/۶۵٪ و ۸۹/۷۳٪) و غلظت ۲۵ و ۱۲/۵ (μg/ml) عصاره آبی بعد از غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ (μg/ml) سولفادیازین، کمترین اثر کشندگی (به‌ترتیب ۱۰/۸۱٪ و ۱۱/۹۲٪) را بر روی سلول‌های ماکروفاژ داشت (جدول‌های ۱۰ و ۱۱).

نتایج حاصل از آزمون سمّیت غلظت‌های مختلف سولفادیازین و عصاره‌های آبی و الکلی مورد بر روی سلولهای ماکروفاژ آلوده به تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما

بیشترین اثر کشندگی پس از گذشت ۲۴ ساعت مربوط به سولفادیازین با غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ (μg/ml) (به‌ترتیب ۸۴/۶۲٪ و ۷۳/۰۸٪) می‌باشد. در بین غلظت‌های مختلف عصاره آبی بیشترین اثر کشندگی مربوط به غلظت ۲۵μg/ml (۲۵٪) و کمترین اثر مربوط به غلظت ۴۰۰μg/ml (۷/۷٪) است. در بین غلظت‌های مختلف عصاره الکلی، غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ (μg/ml) (به‌ترتیب ۳۶/۸۴٪ و ۳۵/۰۹٪) بیشترین اثر و غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ (μg/ml) هر دو به یک نسبت (۲۶/۳۲٪) کمترین اثر کشندگی را دارند و در کل غلظت‌های مختلف عصاره الکلی نسبت به غلظت‌های همسانشان در عصاره آبی، از اثر کشندگی بیشتری برخوردارند (جدول‌های ۱۲ و ۱۳).

جدول ۱۰- درصد Viability حاصل از نتایج MTT بر روی ماکروفاژ J774

غلظت دارو (mg/ml)	عصاره		
	عصاره آبی	عصاره الکلی	سولفادیازین
۱۲/۵	۸۸/۱۰	۸۱/۰۸	۹۴/۵۹
۲۵	۸۹/۱۹	۸۶/۴۹	۹۴/۵۹
۵۰	۸۷/۰۳	۸۳/۷۸	۹۱/۸۹
۱۰۰	۸۶/۴۸	۷۵/۶۸	۴۸/۶۴
۲۰۰	۸۱/۰۸	۶۴/۸۶	۱۱/۳۵
۴۰۰	۷۰/۲۷	۵۹/۴۵	۱۰/۲۷

جدول ۱۱- درصد سیتوتوکسیسیتی حاصل از نتایج **MTT** بر روی ماکروفاژ **J774**

غلظت دارو (**mg/ml**)	عصاره		
	عصاره آبی	عصاره الکلی	سولفادیازین
۱۲/۵	۱۱/۹	۱۸/۹۲	۵/۴۱
۲۵	۱۰/۸۱	۱۳/۵۱	۵/۴۱
۵۰	۱۲/۹۷	۱۶/۲۲	۸/۱۱
۱۰۰	۱۳/۵۲	۲۴/۳۲	۵۱/۳۶
۲۰۰	۱۸/۹۲	۳۵/۱۴	۸۸/۶۵
۴۰۰	۲۹/۷۳	۴۰/۵۵	۸۹/۷۳

جدول ۱۲- درصد **Viability** حاصل از نتایج **MTT** بر روی ماکروفاژهای **J774** آلوده به انگل توکسوپلاسما

غلظت دارو (**mg/ml**)	عصاره		
	عصاره آبی	عصاره الکلی	سولفادیازین
۱۲/۵	۷۶/۲۲	۶۳/۱۶	۹۰/۳۸
۲۵	۷۵/۰۰	۶۴/۹۱	۸۴/۶۱
۵۰	۸۰/۷۰	۶۸/۴۲	۷۶/۹۲
۱۰۰	۸۱/۴۰	۷۰/۱۸	۵۳/۸۴
۲۰۰	۹۱/۵۳	۷۳/۶۸	۲۶/۹۲
۴۰۰	۹۲/۳۰	۷۳/۶۸	۱۵/۳۸

جدول ۱۳- درصد سیتوتوکسیسیتی حاصل از نتایج **MTT** بر روی ماکروفاژهای **J774** آلوده به انگل توکسوپلاسما

غلظت دارو (**mg/ml**)	عصاره		
	عصاره آبی	عصاره الکلی	سولفادیازین
۱۲,۵	۲۳/۷۸	۳۶/۸۴	۹/۶۲
۲۵	۲۵/۰۰	۳۵/۰۹	۱۵/۳۹
۵۰	۱۹/۳۰	۳۱/۵۸	۲۳/۰۸
۱۰۰	۱۸/۶۰	۲۹/۸۲	۴۶/۱۶
۲۰۰	۸/۴۷	۲۶/۳۲	۷۳/۰۸
۴۰۰	۷/۷۰	۲۶/۳۲	۸۴/۶۲

بحث

سولفادیازین و پریمتامین اولین داروهای انتخابی برای درمان توکسوپلاسموز می‌باشند. اگرچه این رژیم درمانی بیشتر اوقات موفق است اما گاهی با عوارض جانبی مانند سرکوب فعالیت مغز استخوان همراه است، بنابراین نیاز به تجویز همزمان اسید فولیک نیز می‌باشد. داروهای گروه سولفونامیدها محدودیت استفاده به ویژه در دوران بارداری دارند و بیشتر اوقات از طرف بیمار به‌خوبی تحمل نمی‌شوند. بنابراین پیدا کردن دارویی که سمّیت کمتری داشته باشد و بتواند علیه تمامی مراحل چرخه زندگی توکسوپلاسما گوندی فعالیت اثربخشی داشته باشد حیاتی است. به همین دلیل داروهای مختلف جدیدی از سوی محققان کشورهای مختلف برای کنترل عفونت توکسوپلاسما مورد مطالعه قرار گرفته است. داروهای گیاهی به‌دلیل عوارض کمتر بسیار مورد توجه محققان می‌باشند (Alipour *et al*., 2014؛ Baharvand-Ahmadi *et al*., 2015؛ Sumbul *et al*., 2011). در کشور ما نیز به‌دلیل تنوع جغرافیایی و اقلیمی گونه‌های گیاهی متنوعی انتشار دارد و در زمینه تأثیرات درمانی گیاهان دارویی تحقیقات وسیعی انجام شده‌است.

در چندین مطالعه خواص ضد انگلی عصاره گیاه مورد بررسی قرار گرفته است. با وجود این، این مطالعه برای اولین بار در ایران و بر روی انگل توکسوپلاسما انجام شده‌است. نتایج نشان داد که با توجه به سولفادیازین که به‌عنوان داروی اصلی مورد استفاده قرار می‌گیرد، عصاره آبی و الکلی مورد در شرایط in vitro اثرهای قابل توجهی بر مهار تکثیر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما و تکثیر داخل سلولی انگل دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین درصد سایتوتوکسیسیتی بر روی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما بعد از گذشت زمان ۳ ساعت در غلظت‌های مختلف سولفادیازین بدست آمد و پس از آن در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ (µg/ml) عصاره آبی مورد بدست آمد. همچنین کمترین درصد سایتوتوکسیسیتی به‌ترتیب مربوط به غلظت ۴۰۰µg/ml عصاره الکلی و آبی مورد بود.

بیشترین درصد سایتوتوکسیسیتی MTT بر روی ماکروفاژ آلوده به انگل مربوط به غلظت ۱۲/۵µg/ml عصاره الکلی (۳۶/۸۴) و غلظت ۲۵µg/ml الکلی (۳۵/۰۹) بدست آمد. در حالیکه میزان سایتوتوکسیسیتی در غلظت‌های مذکور بر روی ماکروفاژ غیرآلوده به‌ترتیب ۱۸/۹۲ و ۱۳/۵۱ بود. علاوه‌بر این مشخص شد که کمترین درصد سایتوتوکسیسیتی بر روی ماکروفاژ غیرآلوده به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ و ۱۲/۵ و ۵۰ (µg/ml) عصاره آبی مورد بود، که در مقایسه با تأثیر کشندگی بالایی که این سه غلظت بر روی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما دارند این تفاوت قابل توجه است. این نتایج بیانگر این است که عصاره‌های مذکور گیاه مورد درصد کشندگی بسیار بالاتری بر روی انگل نسبت به ماکروفاژ دارد. به‌طوری‌که بیشترین درصد سایتوتوکسیسیتی نیز مربوط به غلظت ۴۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ (µg/ml) سولفادیازین بود.

در چندین مطالعه نیز خواص ضد انگلی عصاره گیاه مورد مشخص بررسی شده است. در همین رابطه در تحقیقی مشاهده شد که عصاره الکلی مورد خواص ضد لیشمانیایی بر ضد لیشمانیا تروپیکا دارد (Mahmoudvand *et al*., 2015a). همچنین خواص ضد تریکومونایی عصاره الکلی مورد بر روی تریکوموناس واژینالیس در شرایط in vitro مشاهده شده است (Azadbakht *et al*., 2004). در مطالعه‌ای تأثیر عصاره‌های ۸ گیاه مختلف بر روی پلاسمودیوم فالسیپارم بررسی شده که بهترین تأثیر ضد مالاریایی را عصاره الکلی گیاه مورد داشته است (Milhau *et al*., 1997). همچنین مشخص شده است که عصاره گیاه مورد خواص ضد قارچی بر علیه کاندیدا آلبیکنس (Mahboubi & Ghazian Bidgoli, 2010) و آسپرژیلوس (Mohammadi *et al*., 2008) دارد. محققان تأثیر عصاره الکلی مورد را بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک بررسی نمودند. نتایج آنان نشان داد که عصاره الکلی مورد موجب غیرفعال شدن پروتواسکولکس‌ها شده بدون اینکه خواص سیتوتوکسیک بر بافت میزبان داشته باشد (Mahmoudvand *et al*., 2015b). در مطالعه‌ای، اثرهای

ضد تک‌یاخته‌ای عصاره های گیاهی (سه گیاه آویشن شیرازی، اسپند و مورد) ازجمله گیاه مورد سبز در درمان انگل لیشمانیا در شرایط in vitro انجام شده است. عصاره مورد بهترین تأثیر را از خود نشان داد و فقط در غلظت ۳۱/۲۵μg/ml بی‌تأثیر بود. در غلظت‌های دیگر با داروی کنترل تأثیر مشابهی نشان داد و در غلظت ۵۰۰۰μg/ml نسبت به داروی کنترل (تارتارامتیک) مؤثرتر بود. ترکیب های گیاهی مؤثر علیه گونه‌های پلاسمودیوم ممکن است علیه گونه‌های توکسوپلاسما نیز مؤثر باشند، به‌دلیل اینکه هر دو جنس در گروه اپی‌کمپلکسا قرار دارند و میان آنها ارتباط وجود دارد (Barati *et al*., 2015).

البته تاکنون تأثیرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد انگلی گیاه مورد در مطالعات مختلفی بررسی شده است. با این حال این مطالعه برای اولین بار بر روی انگل توکسوپلاسما انجام شده است (Aleksic & Knezevic, 2014؛ Alipour *et al*., 2014). همچنین مشخص شده است که بخشی از خواص ضد میکروبی مورد به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد (Romani *et al*., 2004). همچنین در مطالعه‌ای ذکر شده است که عصاره برگ گیاه مورد میزان بالاتری عصاره فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد (Amensour *et al*., 2009).

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و الکلی مورد اثرهای قابل توجهی بر مهار تکثیر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما و تکثیر داخل سلولی انگل دارد که می‌تواند راهکارهای درمانی مؤثری را پیش روی محققان و شرکت‌های دارویی قرار دهد.

سپاسگزاری

این تحقیق نتایج بدست‌آمده از پایان‌نامه انگل‌شناسی پزشکی در دانشگاه تربیت مدرس بوده که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است. بدین‌وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه و کلیه همکاران گروه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Aleksic, V. and Knezevic, P., 2014. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. Microbiological Research, 169(4): 240-254.
- Alipour, G., Dashti, S. and Hosseinzadeh, H., 2014. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. Phytotherapy Research, 28(8): 1125-1136.
- Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Bouhdid, S., Perez-Alvarez, J.A. and Fernandez-Lopez, J., 2009. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. Natural Product Communications, 4: 819-824.
- Avci, M.E., Arslan, F., Çiftçi, Ş., Ekiz, A., Tüten, A., Yildirim, G. and Madazli, R., 2015. Role of spiramycin in prevention of fetal toxoplasmosis. Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 29(13): 2073-2076.
- Azadbakht, M., Ziaei, H., Abdollahy, F. and Shabankhani, B., 2004. Effect of methanolic essence and extract of *Myrtus communis* on *Trichomonas vaginalis*. Journal of Guilan University of Medical Sciences, 12(48): 8-13.
- Baharvand-Ahmadi, B., Bahmani, M., Naghdi, N., Saki, K., Baharvand-Ahmadi, S. and Rafieian-Kopaei, M., 2015. Review on phytochemistry, therapeutic and pharmacological effects of myrtus (*Myrtus communis*). Der Pharmacia Lettre, 7(11): 160-165.
- Barati, M., Sharifi, I. and Sharififar, F., 2015. In vitro evaluation of anti-leishmanial activities of *Zataria multiflora* Boiss, *Peganum harmala* and *Myrtus communis* by colorimetric assay. Journal of Kerman University of Medical Sciences, 16(1): 32-42.
- Cerqueira Lima, G.S., Saraiva, P.G.C. and Saraiva, F.P., 2015. Current therapy of acquired ocular toxoplasmosis: a review. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 31(9): 511-517.
- Dalimi, A. and Abdoli, A., 2012. Latent toxoplasmosis and human. Iranian Journal of Parasitology, 7: 1-17.
- Maenz, M., Schlüter, D., Liesenfeld, O., Schares, G., Gross, U. and Pleyer, U., 2014. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. Progress in Retinal and Eye Research, 39: 77-106.
- Mahboubi, M. and Ghazian Bidgoli, F., 2010. In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. Phytomedicine, 17(10): 771-774.
- Mahmoudvand, H., Ezzatkhah, F., Sharififar, F., Sharifi, I. and Dezaki, E.S., 2015a. Antileishmanial

- Neville, A.J., Zach, S.J., Wang, X., Larson, J.J., Judge, A.K., Davis, L.A., Vennerstrom, J.L. and Davis, P.H., 2015. Clinically available medicines demonstrating anti-toxoplasma activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(12): 7161-7169.
- Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F.F. and Franconi, F., 2004. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. Free Radical Research, 38: 97-103.
- Sumbul, S., Ahmad, M.A., Asif, M. and Akhtar, M., 2011. *Myrtus communis* Linn.: a review. Indian Journal of Natural Products and Resources, 2: 395-402.
- Valentini, P., Buonsenso, D., Barone, G., Serranti, D., Calzedda, R., Ceccarelli, M., Speziale, D., Ricci, R. and Masini, L., 2015. Spiramycin/cotrimoxazole versus pyrimethamine/sulfonamide and spiramycin alone for the treatment of toxoplasmosis in pregnancy. Journal of Perinatology, 35: 90-94.
- Vidal, J.E. and Oliveira, A.C., 2013. AIDS-related cerebral toxoplasmosis in São Paulo State, Brazil: marked improvements in the highly active antiretroviral therapy-era but the challenges continue. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 17(3): 379-380.
- Wei, H.X., Wei, S.S., Lindsay, D.S. and Peng, H. J., 2015. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of anti-toxoplasma gondii medicines in humans. PLoS One, 10: e0138204.
- Yan, J., Huang, B., Liu, G., Wu, B., Huang, S., Zheng, H., Shen, J., Lun, Z.-R., Wang, Y. and Lu, F., 2013. Meta-analysis of prevention and treatment of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. Acta Tropica, 127(3): 236-244.

and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. Korean Journal of Parasitology, 53: 21-27.
- Mahmoudvand, H., Fallahi, S., Mahmoudvand, H., Shakibaie, M., Harandi, M.F. and Dezaki, E.S., 2015b. Efficacy of *Myrtus communis* L. to inactivate the hydatid cyst protoscoleces. Journal of Investigative Surgery, 29(3): 137-143.
- Maschke, M., Kastrup, O., Esser, S., Ross, B., Hengge, U. and Hufnagel, A., 2000. Incidence and prevalence of neurological disorders associated with HIV since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). The Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 69: 376-380.
- McLeod, R., Lykins, J., Noble, A.G., Rabiah, P., Swisher, C.N., Heydemann, P.T., McLone, D., Frim, D., Withers, S. and Clouser, F., 2014. Management of congenital toxoplasmosis. Current Pediatrics Reports, 2(3): 166-194.
- Milhau, G., Valentin, A., Benoit, F., Mallié, M., Bastide, J.-M., Pélissier, Y. and Bessière, J.M., 1997. In vitro antimalarial activity of eight essential oils. Journal of Essential Oil Research, 9: 329-333.
- Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E. and Couladis, M., 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. Molecules, 15(4): 2759-2770.
- Mohammadi, R., MIR Hendi Esfahani, S., Shadzi, S. and Moatar, F., 2008. Antifungal activity of *Myrtus communis* L. esssential oil against clinical isolates of *Aspergillus*. Journal of Isfahan Medical School, 26(89): 105-110.
- Montoya, J.G. and Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. Lancet, 363(9425): 1965-1976.

Evaluation the effects of aqueous and alcoholic extracts of *Myrtus communis* L. on tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in vitro

H. Mirzaian[1], F. Ghaffarifar[2*], J. Sadraei[3] and A. Abdoli[4]

1- M.Sc. graduate, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2*- Corresponding authur, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
E-mail: ghafarif@modares.ac.ir
3- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Received: May 2018 Revised: September 2018 Accepted: January 2019

Abstract

Toxoplasmosis is one of the most common zoonotic infections worldwide. The aim of this study was to evaluate anti-*Toxoplasma gondii* activities of aqueous and alcoholic extracts of *Myrtus communis* L. *in vitro*. In this study, effects of aqueous and alcoholic extracts of *M. communis* on *T. gondii*-infected mouse macrophages were evaluated by MTT and direct method. The results showed that the aqueous extract of *M. communis* with concentrations of 12.5 and 25 µg/ml had the highest anti-*T. gondii* activity (87 and 81%), while their lethal effect on non-infected macrophage was less than other concentrations. The present study showed that the aqueous and alcoholic extracts of *M. communis* have a considerable inhibitory effect on *Toxoplasma gondii* tachyzoites and parasite intracellular proliferation in vitro.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, alcoholic extract, aqueous extract, *Myrtus communis* L.