

ارزیابی سایتوتوکسیسیتی و اثرات ضد پلاسمودیومی عصاره‌های اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم چهار منطقه مختلف ایران

هوشنگ افروزان^{۱*}، اکرم ابویی مهریزی^۲، محمدعلی شکرگزار^۳، آذر تحقیقی^۴، علی اسحاقی^۵، نوید دین پرست جدید^۶،
صدیقه ذاکری^{۶*}

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
- ۲- بخش تحقیقات زنبور عسل، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- استادیار، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
- ۴- استاد، انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران.
- ۵- استادیار، بخش فیزیک و شیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
- ۶- استاد، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۶ / مسلسل ۷۲

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱/۱۲ پذیرش مقاله: ۹۶/۲/۱۲

*** مقدمه:** ظهور مقاومت دارویی در برابر انگل مالاریا یکی از مشکلات کنترل و حذف مالاریا در جهان محسوب می‌شود. لذا در این تحقیق به منظور غلبه بر مقاومت دارویی بره موم چهار منطقه متفاوت ایران از نظر سایتوتوکسیسیتی و خواص ضد پلاسمودیومی بررسی شد.

*** مواد و روش‌ها:** بره موم‌های ایران از چهار منطقه مختلف جمع‌آوری و با حلال‌های اتانول ۷۰٪ و دی‌کلرومتان عصاره‌گیری شدند. سایتوتوکسی عصاره‌های بره موم با روش MTT بر روی سلول فیبروبلاست L929 بررسی و اثرات ضد پلاسمودیومی عصاره‌های مختلف بره موم در شرایط درون تنی بر روی موش‌های نژاد BALB/c بررسی شد.

*** یافته‌ها:** عصاره اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم‌های چهار منطقه مختلف ایران در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ غیر سمی بودند. بیشترین درصد مهار رشد انگل *Plasmodium berghei* با ۷۱ و ۶۵ درصد به ترتیب مربوط به عصاره اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم منطقه مرادیگ بود.

*** بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به وجود مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم به داروهای رایج و با توجه به خطرات بروز اپیدمی ناشی از این مقاومت دارویی و اهمیت یافتن و توسعه داروهای مؤثر، ارزان و بی‌خطر در برنامه‌های کنترل و حذف بیماری مالاریا، پیشنهاد می‌شود خاصیت ضد پلاسمودیومی بره موم‌های ایران در تحقیقات تکمیلی مورد بررسی بیشتری قرار گیرند.

*** واژه‌های کلیدی:** ایران، بره موم، سایتوتوکسیسیتی، ضد پلاسمودیوم.

*آدرس مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین.

پست الکترونیک: zakeris@yahoo.com

مقدمه

بره موم یکی از تولیدات زنبور عسل می‌باشد که در دنیا به‌عنوان داروی طبیعی ضد باکتری و ضد قارچ (۱)، ضد ویروس (۲)، ضد التهاب و زخم (۳)، ضد انگل مالاریا (۴) و لیشرمانیا (۵)، ضد تومور (۶)، آنتی‌اکسیدان (۷) و تقویت کننده سیستم ایمنی (۸) گزارش شده است. برای تولید آن زنبوران مسن یا چرایابی ابتدا تکه‌های رزین یا صمغ تراوش شده از جوانه گیاهان را به وسیله پاهای عقب و قطعات دهانی جدا کرده سپس آنها را در داخل سبد گرده در پاهای عقبی قرار داده و به کندو حمل و پس از ترکیب با موم آن را به بره موم تبدیل می‌کنند (۹). بره موم به‌طور متوسط از ۵۵-۵۰٪ صمغ یا رزین، ۳۰-۲۰٪ موم، ۱۰٪ روغن‌های ضروری یا فرار، گرده، ترکیبات آلی و مواد معدنی ۵٪ تشکیل شده است (۱۰). بیش از ۳۰۰ نوع ترکیب مختلف در بره موم گزارش شده است که مهم‌ترین ترکیبات آن شامل ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها، ترپن‌ها و روغن‌های فرار می‌باشد (۱۱). فلاونوئیدها یکی از ترکیبات مهم بره موم می‌باشد که نقش اساسی در فعالیت بره موم ایفا می‌کنند به‌طوری که باعث کشتن و یا بازدارندگی گستره وسیعی از باکتری‌ها و برخی از پاتوژن‌های تک‌یاخته‌ای می‌شوند (۱۲). اثرات سایتوتوکسیسیتی عصاره اتانولی بره موم تایلند بر روی برخی از سلول‌های سرطانی به دلیل فلاونوئیدهای موجود در آن می‌باشد (۱۳). با توجه به اینکه ترکیبات و فلاونوئیدهای موجود در بره موم نواحی مختلف با یکدیگر متفاوت می‌باشد ضروری است که ترکیبات فلاونوئیدهای موجود در بره موم‌های هر منطقه تعیین شود. از طرفی بررسی اثرات توکسیسیتی بره موم‌ها قبل از استفاده از آنها در مصارف مختلف اعم از دارو درمانی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. گزارشات محدودی در مورد بررسی اثرات سمی بره موم در شرایط برون تنی منتشر شده که مربوط به دو گزارش بررسی سایتوتوکسیسیتی بره موم‌های کوبا و لیبی می‌باشد (۱۴، ۱۵). با توجه به اینکه ترکیبات بره موم مناطق مختلف

دنیا با یکدیگر متفاوت می‌باشد (۱۶)، نتایج اثر سمیت بره موم‌های یک منطقه قابل تعمیم به سایر مناطق نبوده و بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی بره موم‌های مناطق مختلف دنیا به‌صورت مجزا مورد ارزیابی قرار گرفته شده است (۱۷). در ارتباط با اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم در شرایط درون تنی تحقیقات بسیار محدودی گزارش شده است (۱۸، ۱۹). با توجه به اینکه تاکنون واکسن مؤثری علیه بیماری مالاریا تولید نشده و در واقع رسیدن به این واکسن به زودی امکان‌پذیر نمی‌باشد، در شرایط کنونی استفاده از دارو علیه انگل جهت مقابله با این بیماری بسیار مورد توجه می‌باشد. از سوی دیگر استفاده مکرر از داروی کلروکین در طی سال‌های متمادی موجب بروز ایجاد مقاومت دارویی در انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم شده است. متأسفانه گزارشات حاکی از کاهش حساسیت و بروز مقاومت به آرتیمیزین در سوبه‌های فالسیپاروم در کشورهای کامبوج، تایلند، میانمار و ویتنام می‌باشد که ممکن است این مقاومت به سایر مناطق آندمیک جهان از جمله ایران گسترش یابد (۲۰، ۲۱). در شرایط کنونی داروی ضد مالاریایی در حد مشتقات آرتیمیزین برای جایگزین شدن وجود ندارد (۲۱). ضمن آنکه داروهای ضد مالاریایی جدید گران بوده و در نتیجه در آینده نزدیک کنترل و حذف بیماری مالاریا با مشکل مواجه خواهد شد. لذا آزمایشگاه‌های متعددی در جهان درصدد تولید و دست یافتن به یک داروی مؤثر، ارزان و بی‌خطر به‌خصوص برای کودکان و زنان باردار مبتلا به مالاریا هستند. بره موم یکی از ترکیبات طبیعی ارزان قیمت و بدون عوارض است که در برخی مطالعات خواص ضد پلاسمودیومی آن گزارش شده است (۲۲، ۱۹، ۱۸). ولی این خاصیت تحت تأثیر پوشش گیاهان مورد استفاده زنبور عسل و همچنین نوع حلال مورد استفاده برای استحصال بره موم قرار داشته و عصاره اتانولی بره موم بهتر از عصاره آبی آن اثرات ضد مالاریایی ایجاد کرده است (۲۲). با توجه به اینکه رنگ و عطر بره موم در مناطق مختلف متفاوت بوده و ویژگی‌های کیفی ترکیبات آن

خشک کردن عصاره‌های صاف شده، در روتاری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره‌های بره موم

بر روی سلول فیبروبلاست L929 موش:

کشت سلول فیبروبلاست موش L929

سلول‌های فیبروبلاست رده NCBI 161 L929 موش از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران دریافت گردید. سلول‌ها در محیط کشت RPMI (دارای پنی‌سیلین و اریترومیسین مقدار $100 \mu\text{g/ml}$ از هر کدام و ال-گلوتامین/گلوتامکس حاوی سرم ۱۰٪ FBS) و در انکوباتور (Memmert, Germany) با دمای 37°C ، $5\% \text{CO}_2$ و رطوبت ۹۰٪ نگهداری شدند. حدود ۴۸ ساعت پس از رشد، سلول‌ها پاساژ داده شده و مجدد در انکوباتور قرار داده شدند.

شمارش سلول فیبروبلاست

جهت شمارش سلولی، با توجه به مقدار سلول فیبروبلاست رشد کرده حدود ۲ الی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم به آن اضافه شد (حجم اولیه). سپس حجم $20 \mu\text{l}$ از تریپان‌بلو ۲۵٪ و همان حجم از سلول‌های فیبروبلاست با هم مخلوط و به آرامی پیتاژ شد. در حدود $20 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون تهیه شده روی لام نئوبار زیر لامل ریخته و تعداد سلول‌های زنده (سلول‌های مرده در اثر رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ آبی دیده می‌شوند) در هر چهار سری خانه‌های شانزده‌تایی در زیر میکروسکوپ شمارش و میانگین گرفته شد (۲۶،۲۷).

تست MTT

جهت انجام تست MTT (دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیوم بروماید)، تعداد ۱۰ هزار سلول فیبروبلاست موش L929 به داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی تخلیه و مقدار $100 \mu\text{l}$ عصاره‌های بره موم در دوزهای مختلف 25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 400 و 800 در ۵ تکرار به سلول‌ها اضافه شد. در چاهک کنترل اول

وابستگی کامل به نوع گیاهان موجود در هر منطقه داشته و در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد (۲۳-۲۵)، لذا در این تحقیق عصاره‌های اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم چهار منطقه دارای پوشش گیاهی متفاوت ایران از استان‌های البرز، همدان، خراسان رضوی و گلستان جمع‌آوری و از نظر سمیت بر روی سلول فیبروبلاست L969 موش بررسی و خواص ضد پلاسمودیومی آنها برای نخستین بار در ایران بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بره موم

بره موم‌ها از چهار منطقه مختلف کشور شامل استان‌های البرز (طالقان) منطقه کوهستانی با پوشش گیاهی *Ferula avina*، همدان (مرادبیگ) منطقه باغی با پوشش گیاهی *Prunus avium* spp و *Populus* spp، خراسان (چناران) منطقه مرتعی با پوشش گیاهی *Juniperus polycarpus* و گلستان (کلاله) منطقه جنگلی با پوشش گیاهی *Poplar plants* در پاییز ۹۳ از کلنی‌های زنبور عسل (*Apis mellifera*) جمع‌آوری شد.

عصاره‌گیری بره موم

بره موم‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فریزر قرار داده شده و با بوته چینی پودر شدند. به‌منظور جدا کردن موم موجود در بره موم مقدار ۳۰ گرم از بره موم هر چهار منطقه مورد مطالعه با 100 ml هگزان مخلوط شده و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در داخل شیکر با دور 120 rpm قرار داده شد. عصاره‌ها را از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده و مواد باقیمانده بر روی کاغذ صافی در زیر هود خشک شد. مقدار ۳ گرم از بقایای خشک شده هر منطقه با 10 ml از حلال‌های اتانول ۷۰٪ و دی‌کلرومتان در ارلن‌های جداگانه مخلوط شدند و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در داخل شیکر با دور 120 rpm قرار داده شدند. عصاره‌ها را از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده و جهت

فقط سلول و محیط کشت حاوی سرم ۱۰٪ و در چاهک کنترل دوم سلول و محیط کشت حاوی سرم ۱۰٪ و حلال عصاره بره موم (۱٪ DMSO) اضافه شد. کلیه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها تخلیه و مقدار ۱۰۰ µl ماده MTT با غلظت ۰/۵ mg/ml به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس رنگ MTT را خارج نموده و مقدار ۱۰۰ µl ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در شیکر قرار داده شد. OD نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزاریدر (ELX808, USA) خوانده شد مقدار IC50 با رسم منحنی و بر اساس دوزهای هر عصاره و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. دوز عصاره‌های بره موم هر منطقه که درصد سلول‌های زنده فیبروبلاست را به کمتر از ۳۰٪ کاهش دهد دوز سمی محسوب می‌شود (۲۸).

بررسی اثرات آنتی پلاسمودیومی عصاره‌های بره موم بر روی موش BALB/c به منظور بررسی اثر ضد پلاسمودیومی عصاره‌های بره موم از سویه حساس به کلروکین Plasmodium berghei ANKA (هدیه گرفته شده از دانشکده بهداشت دانشگاه تهران) استفاده شد. برای تست، موش‌های BALB/c ماده با سن ۶ الی ۸ هفته از انستیتو پاستور ایران تهیه و در حیوان خانه با شرایط ۱۲ ساعت خاموشی و ۱۲ ساعت روشنایی در دمای حدود ۲۲ درجه و رطوبت حدود ۱۵٪ نگهداری شدند. به منظور پاساژ انگل، مقدار ۲۰۰ µl از خون حاوی انگل (1×10^7 گلبول قرمز آلوده)، در دو مرحله متوالی به صورت داخل صفاقی به ۳ موش تزریق شد. پس از گذشت حدود ۵ روز از آخرین تزریق، زمانی که پارازیتمی موش‌های آلوده حدود ۳۰٪ رسید، تمامی موش‌ها قطع نخاع و از قلب آنها خونگیری انجام شد. خون این موش‌ها برای آلوده کردن موش‌ها و ارزیابی اثرات ضد پلاسمودیومی عصاره‌های بره موم استفاده شد. خون‌های آلوده به انگل با بافر PBS 1× (pH: 7.2) در

حجم ۲۰۰ میکرولیتر رقیق و به صورت درون صفاقی به موش‌های گروه‌های درمان و کنترل تزریق شد (۱۸). گروه‌ها در ۵ تکرار (۵ سر موش در هر قفس) شامل عصاره‌های بره موم اتانولی و دی‌کلرومتان با ۳ دوز مجزا شامل mg/kg BW ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰، کنترل دارویی (کلروکین ۲۵ mg/kg BW) و کنترل بدون دارو شامل PBS 1× (pH: 7.2) و کنترل حلال (PBS و ۱۵٪ DMSO) بود. پس از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق خون‌های آلوده (روز اول درمان (D0))، درمان با عصاره‌های بره موم و کلروکین با غلظت‌های ذکر شده به صورت درون صفاقی با حجم ۲۰۰ µl به هر موش تزریق شد. درمان روزی یکبار تا ۵ روز (D0-D4) ادامه یافته و روزانه تزریق انجام شد. در این مدت، خونگیری از دم موش‌ها و تهیه اسمیر برای تعیین درصد پارازیتمی تمامی گروه‌های مختلف انجام شد. بررسی میزان پارازیتمی و بقا موش‌ها به مدت ۲۸ روز (D27) ارزیابی و ثبت شد. محاسبه میزان مهار رشد در گروه‌های درمان و کنترل به شرح زیر انجام شد:

$$100 \times \frac{\text{میزان پارازیتمی در گروه درمان} - \text{میزان پارازیتمی در گروه کنترل منفی}}{\text{میزان پارازیتمی در گروه کنترل منفی}} = \text{درصد مهار رشد}$$

آنالیز آماری

جهت آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS 20 استفاده شد. مقایسه میانگین درصد پارازیتمی موش‌های تحت بررسی در گروه‌های مختلف، با روش One way ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار مقایسه تیمارها از طریق آزمون Tukey در سطح معنی‌داری ۰/۵٪ انجام شد ($P < 0/05$). برای مقایسه بقا موش‌ها، میانه تعداد روزهای بقا موش‌ها با روش منحنی کاپلان مایر انجام شد.

آنالیز عصاره‌های بره موم با روش GC-MS

به منظور تعیین فلاونوئیدهای عصاره‌های اتانولی و دی‌کلرومتان مناطق مختلف از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent 6890N مجهز شده به اسپکتروفتومتر جرمی Agilent Technology 5975C و محفظه تزریق انشعابی/غیر انشعابی و سیستم نمونه‌گیر خودکار COMBI PAI (CTC)

Analytics) موجود در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج تست سایتوتوکسیسیتی در جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که کلیه عصاره اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم مناطق مذکور در مقایسه با IC50 همان منطقه تا دوز 200 µg/ml اثر سمی بر روی سلول‌های فیبروبلاست زنده L929 نداشتند. درحالی‌که تمامی عصاره‌های بره موم مناطق مورد بررسی در دوزهای 400 µg/ml و 800 µg/ml موجب کاهش تعداد سلول‌های فیبروبلاست زنده L929 به 30٪ و کمتر شده و در این دوزها سمی بودند (28).

جدول ۱. نتایج تست سایتوتوکسیسیتی بره موم‌های چهار منطقه

مختلف ایران بر روی سلول فیبروبلاست L929

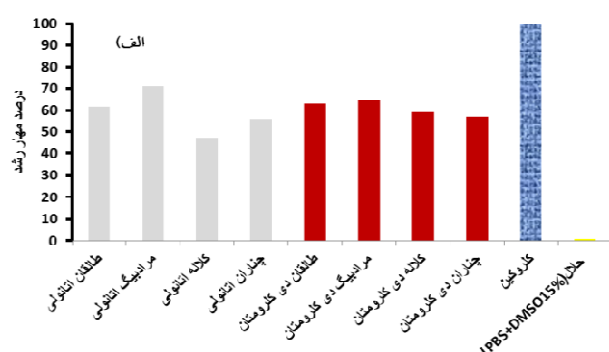
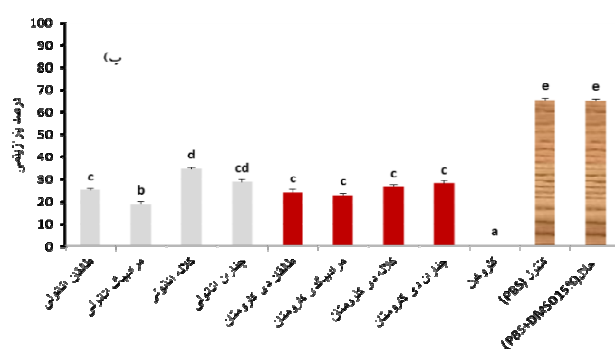
میانگین ± انحراف معیار (سلول‌های فیبروبلاست L929)

عصاره	دوز µg/ml	خراسان رضوی (چناران) IC50=246 µg/ml	گلستان (کلالة) IC50=216 µg/ml	همدان (مرادیگ) IC50=290 µg/ml	البرز (طالقان) IC50=221 µg/ml
اتانول	800	0.127±0.014	0.112±0.016	0.145±0.024	0.150±0.024
70٪	400	0.253±0.051	0.137±0.017	0.183±0.047	0.255±0.065
200	200	0.459±0.040	0.648±0.051	0.744±0.064	0.885±0.029
100	100	0.771±0.069	0.741±0.0197	0.885±0.027	0.911±0.027
50	50	0.794±0.037	0.868±0.031	0.951±0.026	0.927±0.026
25	25	0.847±0.0398	0.897±0.0341	0.954±0.0108	1.054±0.0108
کنترل	کنترل	0.874±0.058	0.948±0.048	0.978±0.039	1.059±0.019
دی‌کلرو	800	0.131±0.034	0.133±0.015	0.075±0.028	0.086±0.025
متان	400	0.432±0.017	0.184±0.033	0.093±0.047	0.118±0.023
200	200	0.832±0.084	0.711±0.043	0.751±0.056	0.856±0.013
100	100	0.896±0.027	0.831±0.016	0.852±0.024	0.863±0.0218
50	50	0.931±0.031	0.875±0.061	0.977±0.058	0.866±0.023
25	25	0.939±0.045	0.920±0.012	0.981±0.028	0.897±0.028
کنترل	کنترل	0.961±0.017	0.943±0.079	1.016±0.005	0.908±0.035
اتیل	800	0.161±0.009	0.135±0.015	0.184±0.005	0.125±0.024
استات	400	0.338±0.034	0.171±0.035	0.187±0.003	0.156±0.012
200	200	0.687±0.070	0.710±0.067	0.772±0.029	0.742±0.047
100	100	0.819±0.055	0.816±0.073	0.786±0.071	0.732±0.025
50	50	0.844±0.075	0.847±0.056	0.841±0.071	0.731±0.048
25	25	0.904±0.012	0.922±0.030	0.921±0.012	0.737±0.007
کنترل	کنترل	0.948±0.017	0.938±0.079	1.016±0.005	0.944±0.035

*توکسیک

بررسی خواص ضد پلاسمودیومی بره موم در شرایط درون تنی نشان داد که بیشترین درصد مهار رشد انگل در عصاره اتانولی بره موم در دوزهای 50 mg/kg BW، 100، 200 به ترتیب با 65/1، 66 و 71 درصد مربوط به منطقه مرادیگ بود. همچنین بیشترین درصد مهار رشد انگل در

عصاره دی‌کلرومتان بره موم در دوزهای مذکور به ترتیب با 59/3، 62 و 65 درصد مربوط به منطقه مرادیگ بود. به‌طور کلی بیشترین درصد مهار رشد در تمامی بره موم‌های مناطق مورد مطالعه مربوط به دوز 200 mg/kg BW و در روز یازدهم پس از درمان بود. عصاره اتانولی مرادیگ با 71 درصد مهار رشد انگل با اختلاف معنی‌دار پس از کلروکین مؤثرتر از سایر عصاره‌های بره موم بود ($P<0.05$) (نمودار شماره ۱ الف و ب). در این بررسی درصد مهار رشد کنترل دارویی (کلروکین) با 100٪ مهار رشد انگل با اختلاف معنی‌دار بهتر از سایر عصاره‌های بره موم بود ($P<0.05$).



نمودار ۱. مؤثرترین درصد مهار رشد (الف) و درصد پارازیتی (ب) انگل پلاسمودیوم برگئی، عصاره‌های بره موم مناطق مختلف ایران در دوز 200 mg/kg BW بر روی موش‌های نژاد BALB/c در دهمین روز پس از آغاز درمان (D9)

بیشترین مدت بقا، موش‌ها پس از آلوده شدن به انگل مربوط به دوز 200 mg/kg BW بود. میانه ماندگاری موش‌هایی که با عصاره‌های دی‌کلرومتان بره موم مناطق مرادیگ، طالقان، کلالة و چناران درمان شده بودند به ترتیب 26، 25، 23 و 23 روز و میانه ماندگاری موش‌های درمان

شده با عصاره اتانولی بره موم مناطق مرادیگ، طالقان، کلاله و چناران به ترتیب با ۲۶، ۲۵، ۲۲ و ۲۳ روز با اختلاف معنی‌دار از موش‌های کنترل منفی (PBS) بدون درمان که میانه ماندگاری آنها ۱۳ روز بود طول عمر بیشتری داشتند ($P=0/003$). موش‌هایی که با کلروکین درمان شده بودند تا پایان زمان بررسی ۲۸ روز و پس از آن زنده بودند. نتایج آنالیز عصاره‌های بره موم با دستگاه GC-MS بیانگر آن است که استفاده از حلال دی‌کلرومتان برای عصاره‌گیری از بره موم‌ها موجب افزایش استحصال فلاونوئیدها نسبت به عصاره اتانولی آنها شده است. به طوری که مهمترین فلاونوئید شناسایی شده در عصاره اتانولی بره موم‌های ایران Pinostrobin chalcone بود، در حالی که در عصاره دی‌کلرومتان بره موم‌های ایران علاوه بر فلاونوئیدهای موجود در عصاره اتانولی فلاونوئیدهای مهم Pinocembrin و Tectochrysin شناسایی شد.

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت دارویی ایجاد شده بر علیه داروهای ارزان، ایمن و طبیعی همانند کلروکین و سولفادوکسین پیریمتامین از مهمترین چالش‌های پیش رو در مسیر کنترل و حذف بیماری مالاریا در جهان محسوب می‌شود (۲۴، ۲۵). با توجه به اینکه منشأ تمامی داروهای مؤثر در درمان مالاریا گیاهی هستند، برای یافتن داروهای ضد مالاریایی جدید با منشأ طبیعی این تحقیق طراحی و خواص ضد مالاریایی و سایتوتوکسیسیتی بره موم چهار منطقه ایران با پوشش گیاهی متفاوت ارزیابی شد. نتایج تست سایتوتوکسیسیتی در جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که کمترین دوز عصاره بره موم که تعداد سلول‌های زنده فیبروبلاست را ۵۰٪ کاهش داده است مربوط به عصاره اتانولی گلستان با $\mu\text{g/ml}$ $IC_{50}=216$ می‌باشد (جدول ۱). لذا کلیه عصاره‌های بره موم‌های مناطق طالقان، مرادیگ، کلاله و چناران تا دوز $200 \mu\text{g/ml}$ غیرتوکسیک (تعداد سلول‌های زنده فیبروبلاست بالاتر از ۵۰٪ داشتند) و در دوزهای $400 \mu\text{g/ml}$ و $800 \mu\text{g/ml}$ که

تعداد سلول‌های زنده فیبروبلاست را به کمتر از ۳۰٪ کاهش دادند، توکسیک بودند (۲۸). در بررسی سایتوتوکسیسیتی عصاره‌های اتانولی ۸۰٪ بره موم که از ۹ استان مختلف در کوبا جمع‌آوری و بر روی سلول‌های فیبروبلاست BALB/c 3T3-A31 و Vero cells انجام شد، دامنه سمیت عصاره‌های بره موم بین $IC_{50}=100 \mu\text{g/ml}$ و $IC_{50}=54/61$ گزارش شد (۲۶). همچنین میزان سایتوتوکسیسیتی عصاره اتانولی بره موم‌های لیبی که از ۶ استان مختلف جمع‌آوری و روی سلول‌های فیبروبلاست U937 تست شده بود بین $35 \mu\text{g/ml}$ الی ۱۰۰ گزارش شد (۱۴). اگرچه نوع سلول مورد استفاده در این دو مطالعه یکسان نمی‌باشد و با سلول فیبروبلاست ایران تفاوت دارد ولی مقایسه نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌های بره موم‌های اتانولی، اتیل استات و دی‌کلرومتان مناطق مختلف ایران در مقایسه با بره موم‌های کوبا و لیبی سمیت کمتری دارد. یکی از عوامل این تفاوت شاید مربوط به تفاوت‌های اقلیمی و پوشش گیاهی مورد استفاده زنبور عسل باشد (۱۶) که البته به تحقیقات بیشتر در این زمینه نیاز می‌باشد. در ارتباط با اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم تحقیقات چندانی در دنیا انجام نشده است. ویجایانت و همکاران در بررسی اثر ضد پلاسمودیومی بره موم کشور تایلند گزارش کردند که بره موم در تقویت سیستم ایمنی و مهار رشد انگل پلاسمودیوم برگئی مؤثر واقع شده و میزان پارازیتمی را کاهش داده بود (۲۹). سیامسودین و همکاران اثر ضد پلاسمودیومی و ایمنی زایی عصاره هیدروالکلی ۱۰٪ بره موم منطقه جاوا در کشور اندونزی را در غلظت‌های g/kg BW ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ بررسی کردند (۱۹). بدین منظور تعداد ۳۰ موش BALB/c که با انگل پلاسمودیوم برگئی آلوده و پس از گذشت ۳ روز با عصاره‌های بره موم در روزهای (D0-D4) به صورت خوراکی درمان شدند. آنها گزارش کردند که بره موم جاوا خواص ایمنی زایی قوی‌تر نسبت به خاصیت آنتی پلاسمودیومی آن در موش‌ها ایجاد کرده و این موضوع باعث افزایش طول عمر موش‌ها شده بود (۱۹). اثر ضد

پلاسمودیومی عصاره متانولی بره موم کشور تانزانیا بر علیه انگل پلاسمودیوم برگئی بر روی تعداد ۱۵ موش طبق روش Rane مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸). بدین منظور تعداد ۱۵ موش به سه گروه ۵ تایی در هر قفس تقسیم شدند و روزانه به تمامی گروه‌ها شامل کنترل منفی (نرمال سالین)، عصاره متانولی بره موم با دوز 600 g/kg BW و کنترل مثبت (کلروکین) داده شد. بر اساس این گزارش کلروکین با $13/55\%$ و عصاره متانولی بره موم با $25/8\%$ پارازیتی با اختلاف معنی‌دار بهتر از کنترل منفی (نرمال سالین) با $35/8\%$ پارازیتی بودند ($P < 0/05$). استفاده از عصاره متانولی بره موم عربستان در دوزهای 25 mg/kg BW ، 50 و 100 به مدت ۷ روز بر روی موش‌های آلوده به انگل پلاسمودیوم برگئی اثرات محافظت کننده بر روی طحال موش‌ها داشته و باعث کاهش معنی‌دار درصد پارازیتی موش‌ها نسبت به کنترل شده و موجب افزایش سایتوکاین‌های $\text{IFN-}\gamma$ ، $\text{TNF-}\alpha$ ، GM-CSF و G-CSF در دوز 100 mg/kg BW شد (۴). گرچه تفاوت در مطالعات ذکر شده از نظر نوع بره موم و همچنین نحوه کاربرد بره موم که به موش‌ها گاوژ کردند، با بره موم‌های ایران که به موش‌ها تزریق شد وجود دارد، ولی نتایج تمامی مطالعات مشابه تحقیق حاضر بیانگر آن است که بره موم می‌تواند با کاهش درصد پارازیتی و افزایش درصد مهار رشد انگل مالاریا باعث افزایش طول عمر موش‌ها شود. بدین ترتیب بره موم می‌تواند به عنوان یک گزینه در توسعه داروهای جدید ضد پلاسمودیومی مطرح باشد که البته نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد. در تحقیق حاضر با توجه به اهمیت فلاونوئیدهای موجود در بره موم که می‌تواند خواص بیولوژیکی بره موم را سبب شود (۳۰، ۳۱)، میزان فلاونوئیدهای عصاره‌های اتانولی و دی‌کلرومتان بره موم مناطق مختلف با GC-MS آنالیز و مقایسه شدند. نتایج نشان داد که استفاده از عصاره‌های دی‌کلرومتان بره موم موجب استحصال فلاونوئیدهای بیشتری نسبت به عصاره اتانولی بره موم‌ها شده است. همچنین در عصاره‌های بره موم

ایران فلاونوئیدهای مهم Pinostrobin و Pinostrobin chalcone که دارای اثرات ضد میکروبی هستند وجود دارد (۳۲). علاوه بر فلاونوئیدها سایر ترکیبات موجود در بره موم مانند ترپن‌ها نیز در ایجاد اثرات ضد میکروبی بره موم مؤثر می‌باشند (۳۳). نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که تنها فلاونوئیدها در ایجاد اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم‌های ایران مؤثر نبودند. از آنجاییکه اثرات ضد پلاسمودیومی بره موم ناشی از فلاونوئیدها و همچنین ترپن‌های موجود در آن می‌باشد (۳۴)، شناسایی ترکیبات مؤثر ایجادکننده اثرات ضد پلاسمودیومی در بره موم‌های ایران نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. در نهایت با توجه به وجود مقاومت دارویی پلاسمودیوم فالسیپاروم به داروهای رایج و در حال استفاده و با توجه به خطرات بروز اپیدمی ناشی از این مقاومت دارویی و اهمیت یافتن و توسعه داروهای مؤثر، ارزان و بی‌خطر در برنامه‌های کنترل و حذف بیماری، شاید بتوان با نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات مشابه قبلی بره موم را به عنوان یک داروی ضد مالاریایی به تنهایی و یا به صورت ترکیبی با سایر داروهای ضد مالاریایی در حال استفاده مورد توجه قرار داد تا بتوان بر این بیماری عفونی کشنده که مانع از رشد اقتصادی کشورهای درگیر است، غلبه یافت. نقطه قوت این تحقیق استفاده از بره موم‌های مناطق مختلف ایران با آب و هوا و پوشش گیاهی متنوع و همچنین مقایسه حلال‌های مختلف برای استحصال بره موم بود که برای نخستین بار در ایران انجام شد. ادامه تحقیق و جداسازی ترکیبات مؤثره بره موم برای بررسی اثرات ضد پلاسمودیومی هریک از آنها تکمیل کننده این تحقیق می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های جناب آقای مهندس مرتضی مهرجویی در مراحل بررسی سایتوتوکسیسیته بره موم‌ها و انستیتو پاستور ایران به خاطر حمایت‌های اجرایی و مالی تشکر می‌گردد.

References

1. Wieczynska A, Wezgowic J, Wiciewicz W, Czarny A, Kulbackas J, Nowakowska D, et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and total phenolic content of different extracts of propolis from the west Pomeranian region in Poland. *Drug Res.* 2017; 74(2): 715-722.
2. Yildirim A, Duran GG, Duran N, Jenedi K, Bolgul BS, Miraloglu M, et al. Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Med Sci Monit.* 2016; 22: 422-430.
3. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Casarin RCV, Alencar SM, Rosalen PL, et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *J Ethnopharmacol.* 2017; 207: 100-107.
4. AlGabbani Q, Mansour L, Elnakady YA, Al-Quraishy S, Alomar S, Al-Shaebi EM, et al. In vivo assessment of the antimalarial and spleen-protective activities of the Saudi propolis methanolic extract. *Parasitol Res.* 2017; 116(2): 539-547.
5. Nina N, Lima B, Feresin GE, Giménez A, Salamanca Capusiri E, Schmeda-Hirschmann G. Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 62(3): 290-296.
6. Alizadeh AM, Afrouzan H, Dinparast-Djadid N, Sawaya AC, Azizian S, Hemmati HR, et al. Chemoprotection of MNNG-initiated gastric cancer in rats using Iranian propolis. *Arch Iran Med.* 2015; 18(1): 18-23.
7. Xavier JA, Valentim IB, Camatari FOS, de Almeida AMM, Goulart HF, Ferro JNS, et al. Polyphenol profile by UHPLC-MS/MS, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of Brazil. *Pharm Biol.* 2017; 55(1): 1884-1893.
8. Soltani EK, Cerezuela R, Charef N, Mezaache-Aichour S, Esteban MA, Zerroug MM. Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 62: 57-67.
9. Meyer W. Propolis bees and their activities. *Bee World.* 1956; 37: 25-36.
10. Pujrahayu N, Ritonga H, Uslinawaty Z. Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *J Pharm Sci.* 2014; 6(6): 338-340.
11. Marcucci MC. Propolis, Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie.* 1995; 26: 83-99.
12. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(2): 167-202.
13. Bufalo MN, Candeias JMG, Sousa JPB, Bastos JK, Sforzi JM. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Nat Prod Res.* 2010; 24(18): 1710-1718.

14. Siheri W, Zhang T, Ebiloma GU, Biddau M, Woods N, Hussain MY, et al. Chemical and Antimicrobial Profiling of Propolis from Different Regions within Libya. PLoS One. 2016; 11(5): 16-22.
15. Syamsudin RM, Rosilawati ML, Cita YP. Antimycobacterial and Antiplasmodial Activities of extract of Propolis from Different Region in Java (Indonesia). Aust J Basic Appl Sci. 2011; 5(11): 1030-1034.
16. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol. 2005; 22(100): 114-117.
17. Filho AAS, Resende DO, Fukui MJ, Santos FF, Pauletti PM, Cunha WR, et al. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharisdracunculifolia* D.C. (Asteraceae). Fitoterapia. 2009; 80: 478-482.
18. Olayemi KI. Therapeutic potentials of Negerian Insect-propolis against the malaria parasite, *Plasmodium berghei* (Hameosporida: Plasmodidae). Amer J Drug Disc Devel. 2014; 4(4): 241-247.
19. Syamsudin RM, Kusmardi D. Immunodulatory and In vivo Antiplasmodial Activities of Propolis Extracts. Am J Pharmacol Toxicol. 2009; 4(3): 75-79.
20. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phy AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. New Eng J Med. 2009; 361: 455-457.
21. WHO. Malaria Report 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/20018/1/9789241565158_eng.pdf
22. Jirattikarn K, Pawornrat N, Atsalek R, Pakorn W, Chanpen C. Preliminary Screening for Various Bioactivities in Honey and Propolis Extracts from Thai Bees. Eur J Med Plants. 2012; 2(2): 74-92.
23. Sawaya AC, Abdelnur PV, Eberlin MN, Kumazawa S, Ahn MR, Bang KS, et al. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Talanta. 2010; 81(1): 100-108.
24. Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. J Agric Food Chem. 2004; 52: 1100-1103.
25. Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000; 31: 3-15.
26. Frión-Herrera Y, Díaz-García A, Rodríguez-Sánchez H, Ruiz-Fuentes JL, Fidalgo LM, Setzer WN. Cytotoxic effect of Cuban propolis xtracts on normal cells and in-vitro basal toxicity assay to estimate acute oral toxicity. Am J Ess Oil Nat Prod. 2014; 2(1): 19-23.
27. Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone- stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. Prostate. 1988; 12: 99-110.
28. Jahromi MZ, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp

- fibroblasts. *J Dent Res, Dent Clin, Dent Prospects*. 2014; 8(3): 130.
29. Wijayant MA, Herdiana E, Mardihusodo DSY. Efek bee propolis terhadap infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit Swiss. *ISJD*. 2003; 35(2): 81-89.
 30. Khaomek P, Ichino C, Ishiyama A, Sekiguchi H, Namatame M, Ruangrunsi N, et al. In vitro antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *J Nat Med*. 2008; 62(2): 217-220.
 31. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Yu, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. *J Ethnopharm*. 1999; 64: 235-240.
 32. Monzote L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M, Márquez Hernandez I, Fraga J, Pérez K, et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(8): 978-984.
 33. Ruddock PS, Charland M, Ramirez S, López A, Neil Towers GH, Arnason JT, et al. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis*. 2011; 38(2): 82-88.
 34. Popova M, Chinou IB, Marekov LK, Bankova SV. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*. 2009; 70(10): 1262-1271.

Assessment of the cytotoxicity and in vivo anti-Plasmodial activity of ethanol and dichloromethane extracts of four different Iranian propolis

Afrouzan H^{1,2}, Abouie Mehrizi A³, Shokrgozar S⁴, Tahghighi A³, Es-haghi A⁵, Dinparast Dgadid N⁶, **Zakeri S^{6*}**

1. PhD Student, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2. Honey bee Department, Animal Sciences Research Institute, Karaj, Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3. Assistant professor, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

4. Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran.

5. Assistant professor, Department of Physics and Chemistry, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

6. Professor, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, zakeris@yahoo.com

Received: 10 April 2017 **Accepted:** 2 May 2017

Abstract

Background: The emergence of antimalarial drug resistance is one of the great problems of malaria control and elimination of worldwide. In order to overcome anti-malarial drug resistance, cytotoxicity and *in vivo* anti-*Plasmodium* activity of four different Iranian propolis were investigated.

Materials and Methods: Four Iranian propolis samples were collected from four different regions of Iran and extracted by %70 ethanol and dichloromethane. The cytotoxicity of ethanolic and dichloromethane extract of propolis, using L969 fibroblast cell lines, were evaluated by MTT assay. The *in vitro* anti-*Plasmodium* activities of the propolis samples on BALB/c mice were assayed.

Results: The cytotoxicity results showed that ethanol and dichloromethane extracts of four Iranian propolis samples at doses of 25, 50, 100 and 200 µg/ml were non-toxic ($P < 0.05$). The highest percentage of growth inhibition against *Plasmodium berghei* with %71 and %65 was for ethanol and dichloromethane extract of Morad Byge propolis, respectively.

Conclusion: Considering the drug resistance of *P. falciparum* to conventional medicine and its dangers, and the emergence of development cheap and safe anti-malaria drugs to control and eliminate programs. Further investigation on Iranian propolis as safe and anti-malarial drug is recommended.

Keywords: Iran, Propolis, Cytotoxicity, Anti-plasmodium.

***Citation:** Afrouzan H, Abouei mehrizi A, Shokrgozar S, Tahghighi A, Es-haghi A, Dinparast Dgadid N, Zakeri S. Assessment of the cytotoxicity and in vivo anti-*Plasmodium* activity of ethanol and dichloromethane extracts of four different Iranian propolis. *Yafte*. 2017; 18(4): 115-125.