چکیده

مقدمه و اهداف: لیشمانیازیس بیماری مهمی از نظر بهداشتی در جهان محسوب میشود که داروی موثر اندکی دارد.گیاه *Gossypium hirsutum* در طب سنتی داروی گیاهی برای درمان لیشمانیا گزارش شده است.هدف از انجام این مطالعه ارزیابی فعالیتهای سیتوتوکسیسیتی، آپوژتوزیس و نکروزیس عصاره قوزه پنبه و فرکشنه های آن علیه پروماستیگوت ها و مدل آماستیگوت – ماکروفاژی و موشهای بالب سی و ارزیابی اثرات سیتوتوکسیسیتی عصاره گیاه بر سل لاین های $HepG_2$، A549، MCF7 و U87 می باشد.

روشها: عصاره تام کلروفرمی قوزه پنبه با روش کروماتوگرافی ستونی با استفاده از سیلیکاژل به عنوان فاز ثابت فرکشنه شد. غلظت های مختلف عصاره و فرکشنه های آن علیه لیشمانیا ماژور ارزیابی و نتایج با گلوکانتیم پس از کشت در محیط شامل پنی سیلین-استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد، مقایسه شد. چگالی نوری توسط الیزا برای تعیین ۵۰ درصد غلظت بازدارنده عصاره و فرکشنه هایش برای مرحله کلینیکی،آماستیگوت-ماکروفاژ که با غلظت های مختلف عصاره تلقیح شده بود برای ۷۲ ساعت و سه بار تکرار به کار رفت. میزان آپوپتوز و نکروز ب روش فلوسایتومتری محاسبه شد. برای سنجش فعالیت لیشمانیایی عصاره و فرکشنه های آن، ۴۵ موش بالب سی (قبلا با دو میلیون پروماستیگوت از لیشمانیا ماژور که در فاز ساکن بودند تلقیح شدند) به طور تصادفی در ۹ گروه تقسیم بندی شدند و قطر زخم ها و تورم کف پای موشها هفتگی به مدت یک ماه اندازه گیری شد. آنالیز آماری داده ها با روش تی تست، آنووا و اندازه گیری مکرر نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته ها: با روش کروماتوگرافی ستونی،۱۲ فرکشن از عصاره مورد نظر به دست آمد. عصاره پنبه و دو فرکشنه موثر آن (F4 و F5) از تکثیر پروماستیگوت ها و آماستیگوت های لیشمانیا ماژور وابسته به غلظت پس از ۷۲ ساعت جلوگیری می کند. فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره پنبه با IC50 ۹۶/۳ میکروگرم برمیلی لیتر و ۱۸/۹ میکروگرم برمیلی لیتر به ترتیب برای پروماستیگوتها و آماستیگوت ها گزارش شد. پتانسیل ضد لیشمانیایی عصاره تام و F4 و F5 خیلی بیشتر از گلوکانتیم برای هر دو مرحله لیشمانیا بود. IC_{50} به ترتیب برای F4 و F5، ۱۲۶/۴ میکروگرم برمیلی لیتر و ۱۶/۳ برای پروماستیگوت ها و ۱۵۴/۶ میکروگرم برمیلی لیتر و ۲۱/۳ میکروگرم برمیلی لیتر برای آماستیگوت ها محاسبه شد. سمیت سلولی معنی داری با استفاده از شاخص حساسیت که فراتر از هزار بود، دیده نشد.میانگین آپتوز عصاره و فرکشنه ها نسبت به گلوکانتیم بالاتر بود. بهترین فعالیت لیشمانیایی در موشه های بالب سی ای دیده شد که به ترتیب با فرکشنه های موثر و عصاره تام تحت درمان بودند. عصاره قوزه پنبه فعالیت ضد تکثیری-سمیت بر سل لاین های $HepG_2$، A549، MCF7 و U87 نشان داد. تست های آنتی اکسیدانی DPPH و فرپ نشان دهنده میزان بالای آنتی اکسیدان در عصاره تام بود.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه کنونی نشان داد که تاثیرات ضد لیشمانیایی عصاره پنبه علیه لیشمانیا ماژور بیشتر از گلوکانتیم بود. سمیت سلولی در ارتباط با عصاره دیده نشد و شاخص آپوپتوز عالی عصاره، نشان از یک مکانیزم اثر مناسب برای مرگ انگل می باشد.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز پوستی، گوسیپیوم هیرسوتوم، ضد لیشمانیایی، آماستیگوت ها، پروماستیگوت ها، فرکشنه کردن، آپوپتوزیس.

ABSTRACT

Background and Objective: Leishmaniasis represents a major global health problem with a few effective therapeutic drugs. *Gossypium hirsutum* has been reported as a traditional herbal medicine to cure cutaneous leishmaniasis. This study was aimed to evaluate the leishmanicidal activities, cytotoxicity, apoptosis and necrosis of *G. hirsutum* bulb extract and its fractions on *Leishmania major* promastigotes, amastigote-macrophage model and BALB/C mice and evaluation of cytotoxicity effect of the plant on HepG2, A549, MCF7 and U87.

Methods: Crude chloroform extract of the plant bulb was fractionated with a column chromatography method using silica gel as stationary phase. Various concentrations of extract and its fractions were evaluated against *Leishmania major* in comparison with Glucantime® in a medium containing penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS) at 24ºC. Optical density (OD) was measured by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) to determine the 50% inhibitory concentration value (IC_{50}) of sample extract and its fractions. For clinical stage, intramacrophage amastigotes were incubated at various concentrations of the extract for 72 h in triplicates. The apoptotic and necrotic values were analyzed by flowcytometry. In order to evaluate *in vivo* leishmanicidal activity of the extract and fractions, 45 balb/c mice (previously inoculated with 2×10^6 promastigotes stationary phase metacyclic promastigotes of *L. major*) were randomly distributed into nine groups and the lesions diameter and swelling of footpads of the mice were measured weekly for a month. Statistical analyses of data were carried out using t-test, ANOVA, and repeated measure by SPSS software.

Result: Following colomn chromatography fractionation of the extract, 12 fractions were achieved. *G. hirsutum* extract and two effective fractions (F4 and F5) inhibited *L major* promastigotes and amastigotes proliferation rates in a dose-dependent response at 72h post-treatment. The leishmanical activity as displayed by IC_{50} values resulted in 96.3μg/ml and 18.9 µg/ml for promastigotes and amastigotes, respectively.The overall leishmanicidal potency of the crude extract and fractions F4 and F5 was much greater than that of Glucantime® for both *L. major* stages. The IC_{50} of F4 and F5 were measured at doses of 126.4 µg/ml and 16.3 µg/ml for promastigotes and doses of 154.6 µg/ml and 21.3 µg/ml for amastigotes, respectively. There was

no significant cytotoxicity effect as the selectivity index (SI) was over 1000, far beyond ≥10. The mean apoptotic values for *L major* were superior compared to Glucantime®. The best antileishmanial activity was shown in balb/c mice that trated with effective fractions and crude extract, respectively. *G.hirsutum* bulb extract displayed potent antiproliferation cytotoxicity index against A549, U87, MCF7, and HepG2 cancer cell lines. DPPH and FRAP tests showed a great antioxidant power for the crude extract.

Conclusion: The present study demonstrated that *G. hirsutum* has much stronger antileishmanial effects against *L major* than that of Glucantime®. No cytoxicity effects were associated with the extract and induced an excellent apoptotic index, a possible mechanism of parasite death.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, *Gossypium hirsutum*, Leishmanicidal, Amastigotes, Promastigoes, Fractionation, Apoptosis.