● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفدهم، شمارهٔ ۱، ص ۴۱-۳۲، ۱۳۸۸

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثرات ضدلیشمانیایی عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ‌سنجی به صورت برون‌تنی *(In vitro)*

محمد براتی[۱]، دکتر ایرج شریفی[*۲]، دکتر فریبا شریفی‌فر[۳]

خلاصه

مقدمه: عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده آنها منبع غنی عوامل دارویی جدید را فراهم می‌کنند و از گیاهان بومی برای درمان بسیاری از عوامل عفونی استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق، تعیین اثر ضدلیشمانیایی سه عصاره گیاهی در مقایسه با ترکیب سه‌ظرفیتی آنتیموان بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با استفاده از روش رنگ‌سنجی(Colorimetric assay) می‌باشد.

روش: پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور (Leishmania major) در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FCS) و آنتی‌بیوتیک در دمای ۲۵±۲°C کشت داده شد و با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT، تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی در مقایسه با ترکیب سه‌ظرفیتی آنتیموان (تارتارامتیک) بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور، مورد بررسی قرارگرفت. میزان جذب نوری (Optical density) رنگ حاصله از احیاء نمک تترازولیوم (MTT) به محصول رنگی فورمازان توسط انگل، به‌وسیله دستگاه الیزا ریدر (ELISA reader) سنجیده شد و مقدار IC_{50} که ۵۰٪ غلظت مهارکننده است، محاسبه گردید.

یافته‌ها: عصاره‌های مورد نظر و داروی تارتارامتیک هر دو رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را در شرایط آزمایشگاهی مهارکردند. میزان IC_{50} تارتارامتیک برابر با ۴/۷μg/ml، و از عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد به‌ترتیب ۷/۴، ۷/۲ و ۵/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. اگرچه داروی تارتارامتیک در مقایسه با این عصاره‌ها تأثیر بیشتری نشان داد اما همه این عصاره‌ها بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای نشان دادند.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد به‌صورت برون‌تنی به‌خوبی اثرات ضدلیشمانیایی از خود نشان داده‌اند، لزوم انجام آزمایشات بیشتری برای ارزیابی اثر این عصاره‌ها بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، آویشن شیرازی، اسپند، مورد، عصاره‌های گیاهی، روش MTT

۱- کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات لیشمانیوز و دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد گروه انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات لیشمانیوز و دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- استادیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، کرمان ● **آدرس پست الکترونیک:** iraj.sharifi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۲/۱۸ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۸/٤/۱۵ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۸/۵/۷

مقدمه

لیشمانیوز مجموعه‌ای از بیماری‌های تک‌یاخته‌ای قابل انتقال بین انسان و حیوان است که در اغلب نقاط دنیا وجود دارد، به‌طوری که در ۸۸ کشور جهان شایع است (۱،۲). این بیماری همواره به عنوان یک مشکل بهداشتی مهم مورد توجه بوده و باعث زیان‌های مالی و جانی فراوانی می‌شود (۳). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO) لیشمانیوز در حال حاضر حدود ۱۲ میلیون نفر را تحت تأثیر قرار داده و در عین حال تخمین زده می‌شود که حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به آن قرار دارند (۶-۴، ۱). بروز سالیانه موارد جدید درحدود ۲ میلیون نفر است که تنها ۱/۵ میلیون نفر به لیشمانیوز پوستی مبتلا می‌شوند (۴،۶).

داروهای خط اول در درمان این بیماری‌ها ترکیبات آنتیموان پنج‌ظرفیتی ازجمله، مگلومین آنتیمونات (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) می‌باشند (۹-۷)، که از ۶۰ سال قبل تاکنون به عنوان داروی انتخابی همواره مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۷). این ترکیبات با اثر بر روی آنزیم‌های انگلی به خصوص وقفه در آنزیم فسفوکیناز باعث جلوگیری از تولید آدنوزین‌تری فسفات می‌شوند (۸).

در سال‌های اخیر، افزایش میزان مقاومت به آنتیموان‌های پنج‌ظرفیتی منجر به معرفی ترکیبات ضدلیشمانیایی جدیدی نظیر میلتفوسین، آمفوتریسین B، کتوکونازول، پاروموماسین و سایر ترکیبات شیمیایی شده است (۱۲-۱۰). در عین حال هیچ‌کدام از این داروها بدون اثرات جانبی نیستند (۳،۱۱) و همچنین سمیت این عوامل و پایدارماندن اثرات جانبی حتی بعد از اصلاح میزان دوز دارو و درمان طولانی مدت از جمله نقایص آنها می‌باشد (۳). از طرفی این درمان‌ها به‌ویژه در مناطق روستایی به‌دلیل هزینه‌های سنگین و عدم دسترسی بدان مناسب نمی‌باشد (۲).

با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هر گونه عارضه هستند و از طرفی در دسترس و ارزان می‌باشند، این موضوع ضرورت استفاده ازگیاهان بومی هر منطقه را بدین منظور مورد تأکید قرار می‌دهد (۲). عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده‌ی آنها احتمالاً منبع غنی از عوامل دارویی جدید را فراهم می‌کنند (۳،۱۰،۱۲). برخی محصولات طبیعی، به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات ضدلیشمانیایی محسوب می‌شوند (۱۰،۱۳). به‌طوری که معمولاً در کشورهای اندمیک از گیاهان بومی برای درمان بسیاری از عوامل عفونی استفاده می‌شود. اخیراً پیشرفت‌های زیادی در زمینه استفاده از داروهای گیاهی در درمان لیشمانیوز حاصل شده است (۱).

هدف از این تحقیق، تعیین اثرات ضدلیشمانیایی تعدادی از عصاره‌های گیاهی استخراج شده بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT می‌باشد.

روش بررسی

این تحقیق به روش تجربی (Experimental) بر روی انگل لیشمانیا ماژور با کد ملی (MRHO/IR/75/ER) تهیه شده از مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

تهیه عصاره‌های گیاهی

گیاهان آویشن شیرازی (Zataria multiflora Boiss)، اسپند *(Peganum harmala)* و مورد *(Myrtus communis)* از اطراف شهرستان کرمان جمع‌آوری و نمونه هرباریومی آنها برای شناسایی تهیه گردید. سپس گیاهان جمع‌آوری شده در سایه خشک و بعد از آسیاب‌کردن با روش پرکولاسیون با متانول ۸۰٪ عصاره‌گیری شدند (۱۴). در پایان، تمام عصاره‌های به‌دست آمده با روش تقطیر در خلأ تا حد

خشک‌شدن تغلیظ و تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شدند.

تهیه و آماده‌سازی انگل

پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری دارای محیط کشت RPMI-1640 (Gibco-BRL) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco-BRL) که قبلا کمپلمان آن در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شده و حاوی ۱۰۰ Iu/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (Gibco- BRL) بود منتقل و در دمای ۲۵±۲°C، کشت داده‌شد.

شمارش انگل

با استفاده از لام نئوبار تعداد پروماستیگوت‌هایی که در محیط کشت RPMI-1640 به فاز ثابت رشد (Stationary - phase) رسیدند، در زیر میکروسکوب شمارش و به تعداد 5×10^5/ml سلول تعدیل گردید.

داروی کنترل

در این بررسی همانند مطالعات مشابه از داروی تارتارامتیک (Tartar emetic) به‌عنوان کنترل به دلیل این که بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا تأثیر بیشتری در محیط کشت دارد، استفاده شد (۱۵،۱۶). این دارو یک آنتیموان سه‌ظرفیتی است که به صورت پودر از شرکت Merck آلمان تهیه شده که دارای فرمول زیر می‌باشد:

(Potassium antimony (III) oxide tartrate hemihydrate)

$C_4H_4KO_7Sb \cdot 0/5\ H_2O$ > ٪۹۹ (Merck-Germany)

روش MTT

برای ارزیابی اثرات عصاره‌ها و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور از روش MTT استفاده شد. این روش، یک روش رنگ‌سنجی است که طی آن نمک تترازولیوم (Tetrazolium salt) [3- (4,5- dimethylthiazol- 2- yl) -2, 5- diphenyl tetrazolium bromide] MTT به یک محصول رنگی فورمازان نا محلول تبدیل می‌شود (۱۹-۱۷، ۱۱،۱۳). این واکنش احیاء، توسط فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل انجام می‌شود (۱۱،۱۳،۱۹) که به‌عنوان یک مؤلفه رشد و زنده‌بودن پروماستیگوت در برابر پاسخ دارویی به‌کار می‌رود (۱۹). برای تهیه محلول MTT، 5mg پودرMTT در ۱ml محلول PBS استریل (5mg/ml) حل می‌شود.

اضافه‌کردن پروماستیگوت‌ها به پلیت

از پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور موجود در محیط کشت RPMI-1640 که در فاز ثابت رشد (Stationary phase) بودند به میزان ۱۰۰µl برداشته و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت دوبل (Duplicate) اضافه شد به‌نحوی که در هر چاهک 5×10^5 پروماستیگوت قرارگیرد.

اضافه‌کردن دارو و عصاره‌ها به پلیت

در ادامه از عصاره‌های مختلف و داروی کنترل که به‌ترتیب در غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شده‌بودند به میزان ۱۰µl به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به‌صورت دوبل، اضافه‌گردید. علاوه بر این از شاهد (بلانک) نیز استفاده شد. به این صورت که در یک چاهک پلیت، فقط ۱۰۰µl محیط کشت فاقد پروماستیگوت و یا دارو اضافه گردید. همچنین به دو چاهک دیگر فقط پروماستیگوت‌های انگل به‌عنوان کنترل اضافه شد و بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، پلیت‌ها خارج‌شده و به میزان ۱۰٪ حجم هر چاهک از محلول ذخیره MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که قبلاً تهیه شده‌بود ریخته‌شد. چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰µl محیط کشت

و فقط ۱۰µl از محلول MTT می‌باشد. متعاقباً پلیت‌ها به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۲۵±۲C° انکوبه شدند. بعد از مدت زمان انکوباسیون، پلیت‌ها از انکوباسیون بیرون آورده‌شدند و کریستال‌های فورمازان با حجمی معادل محیط کشت اولیه یعنی معادل ۱۰۰µl به هر چاهک از محلول ایزوپروپانل اسیدی (اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال در ایزوپروپانل خالص) جهت حل کردن رنگ، افزوده و رنگ حاصله در طول موج ۴۹۲nm با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader) قرائت شد و جذب نوری به‌دست آمده، برای تعیین میزان IC_{50} (Inhibitory concentrations 50%) که غلظتی از عصاره است که از رشد ۵۰٪ ارگانیسم جلوگیری می‌کند، محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

در این بررسی از آزمون آماری ANOVA برای مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه‌ها و در صورت معنی‌دار بودن از آزمون Post Hoc- dunnett برای تعیین اثربخشی داروی کنترل و عصاره‌ها استفاده شد. علاوه بر این سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ و فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪ در نظر گرفته شد. نرم‌افزار SPSS version 17.0 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، مورد استفاده قرار گرفت.

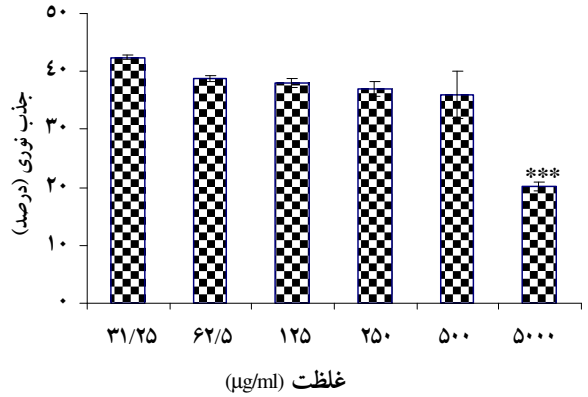
همچنین با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader) و جذب نوری (OD) به‌دست آمده براساس فرمول زیر میزان IC_{50} با نرم‌افزار EXCEL محاسبه گردید:

$$\text{Log } (IC_{50}) = \log(x_1) + [(y_1 - y_0/2)/(y_1 - y_2)]\,[\log(x_2) - \log(x_1)].$$

در فرمول فوق y_1 مقدار انگل درغلظت x_1 و همه غلظت‌های کمتر و y_2 مقدار انگل در غلظت x_2 و همه غلظت‌های بیشتر می‌باشد. همچنین y_0 مربوط به جذب نوری گروه کنترل است که نشان‌دهنده مقدار انگل مربوط به کنترل می‌باشد.

نتایج

در این مطالعه اثر ضدلیشمانیایی سه عصاره گیاهی در مقایسه با داروی تارتارامتیک به‌عنوان کنترل بررسی شد. تغییرات جذب نوری به‌وسیله دستگاه الایزا ریدر قرائت و روند تأثیر دارو و عصاره سنجیده شد. ابتدا اثربخشی تارتارامتیک به تنهایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف آن (۳۱/۲۵-۵۰۰۰µg/ml) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) که این اختلاف در آزمون Post Hoc مربوط به اختلاف در غلظت ۵۰۰۰µg/ml با سایر غلظت‌ها بوده و موجب مهار رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور گردیده است (نمودار ۱).



نمودار ۱. *مقایسه میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور*

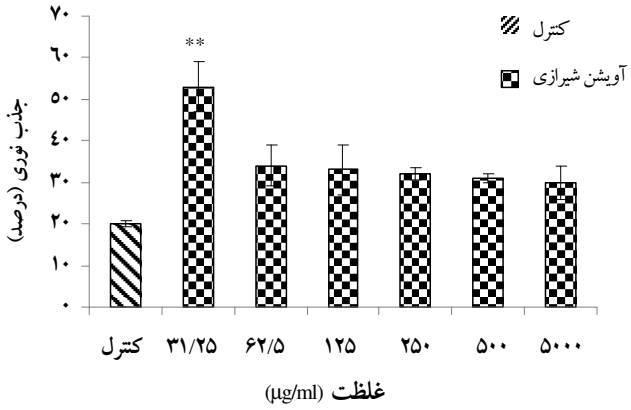
*** تفاوت معنی داری بین غلظت ۵۰۰۰µ g/ml با سایر غلظت ها مشاهده شد (P < ۰/۰۰۱).

با توجه به این‌که غلظت ۵۰۰۰µg/ml داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌ها در مقایسه با سایر غلظت‌ها بهترین تأثیر را نشان داد، برای بررسی تأثیر هر کدام از عصاره‌ها، از مقایسه اثربخشی بین غلظت‌های مختلف هر عصاره و غلظت ۵۰۰۰µg/ml داروی کنترل استفاده شد و نتایج آن به‌صورت جدول و نمودار رسم گردید.

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها

آویشن شیرازی

مقایسه تأثیر عصاره آویشن شیرازی و داروی کنترل نشان داد که میانگین جذب نوری بین آنها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵) به‌طوری که در غلظت ۳۱/۲۵µg/ml به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) میانگین جذب نوری بالاتری وجود داشت در حالی که بین سایر غلظت‌ها و داروی کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار۲).



نمودار ۲. *مقایسه میانگین جذب نوری عصاره آویشن شیرازی و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور*

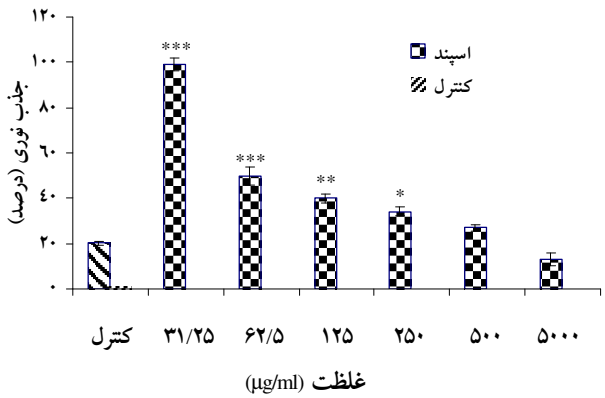
**(P<۰/۰۱). کنترل: داروی تارتارامتیک

اسپند

تأثیر غلظت‌های مختلف این عصاره در مقایسه با داروی کنترل، اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۰۱) به‌طوری که در غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ ، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌صورت معنی‌داری (به ترتیب P<۰/۰۰۱ ، P<۰/۰۰۱، P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵) میانگین جذب نوری بالایی وجود داشت در حالی که در سایر غلظت‌ها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۳).

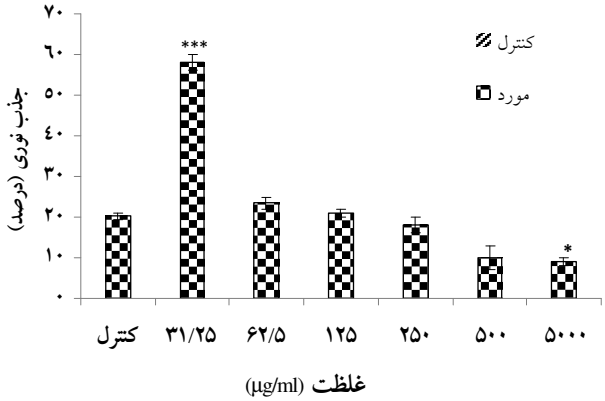
مورد

بررسی تأثیر عصاره مورد در مقایسه با داروی کنترل نیز نشان داد که میانگین جذب نوری این عصاره و داروی کنترل از نظر آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). این عصاره در غلظت ۳۱/۲۵ µg/ml به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) میانگین جذب نوری بالاتر و در غلظت‌های ۵۰۰۰ µg/ml به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) میانگین جذب نوری کمتری و در غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جذب نوری مشابه با کنترل، نشان داد (نمودار ۴).



نمودار ۳. *مقایسه میانگین جذب نوری عصاره اسپند و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور*

***(P < ۰/۰۰۱) و **(P<۰/۰۱) و*(P<۰/۰۵). کنترل: داروی تارتارامتیک



نمودار ۴. *مقایسه میانگین جذب نوری عصاره مورد و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور*

***(P < ۰/۰۰۱) و *(P<۰/۰۵) کنترل: داروی تارتارامتیک

علاوه بر آنالیز آماری، IC_{50} (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد ۵۰٪ از انگل‌ها می‌شود) نیز برای هر کدام از عصاره‌ها و داروی کنترل محاسبه شد. در روش MTT با تأثیر عصاره‌ها و داروی کنترل بر روی مرحله پروماستیگوت لیشمانیا ماژور، IC_{50} برابر ۵/۸–۷/۴µg/ml به‌دست آمد. به‌طوری که IC_{50} داروی کنترل ۴/۷µg/ml محاسبه شد که نشانگر تأثیر تارتارامتیک در غلظت ۴/۷µg/ml است. همچنین IC_{50} هر کدام از عصاره‌ها به صورت جداگانه محاسبه و IC_{50} عصاره آویشن شیرازی برابر با ۷/۴µg/ml، عصاره اسپند برابر با ۷/۲µg/ml و عصاره مورد ۵/۸µg/ml به‌دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱. *مقایسه میزان IC_{50} داروی کنترل و عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور*

داروی کنترل و عصاره‌های گیاهی	IC_{50} µg/ml
تارتارامتیک	۴/۷
آویشن شیرازی	۷/۴
اسپند	۷/۲
مورد	۵/۸

بحث و نتیجه‌گیری

لیشمانیوز به‌عنوان یک مشکل بهداشتی در اکثر کشورهای جهان به‌ویژه در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری ازجمله ایران، محسوب می‌شود. این بیماری در سراسر جهان انتشار دارد و ۹۰٪ موارد آن در ۷ کشور جهان شامل افغانستان، الجزایر، ایران، برزیل، پرو، سوریه و عربستان سعودی وجود دارد (۴،۵،۲۰).

در ایران در زمینه‌ی اثرات ضدتک‌یاخته‌ای گیاهان دارویی، تحقیقات وسیعی انجام شده است که از جمله آنها، بررسی اثرات ضدمالاریایی و ضدتریکومونایی درمنه کوهی و همچنین گیاه مورد و آویشن شیرازی بر تریکوموناس واژینالیس می‌باشد (۲۱). در طب محلی نیز از غوزه پنبه به صورت موضعی برای درمان سالک استفاده می‌شده است (۲۲). از طرفی اثرات ضدلیشمانیایی برخی از گیاهان دارویی نیز بر روی پروماستیگوت‌های انگل، بررسی شده است (۲۳).

آزمایش‌هایی که در حال حاضر برای بررسی داروها و ترکیبات ضدلیشمانیایی به‌کار برده‌می‌شوند، دارای محدودیت‌های فراوانی می‌باشند، از جمله این که، خطرناک هستند، نیاز به پیش‌سازهای رادیواکتیو از قبیل ۳H-تیمیدین دارند و یا بسیار پر زحمت و وقت‌گیر می‌باشند (۱۱،۲۴). برای تعیین زنده‌بودن (Viability) پروماستیگوت‌های لیشمانیا تاکنون چندین روش ابداع و معرفی شده‌است که شامل شمارش سلول‌های زنده، اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و واکنش احیای نمک تترازولیوم می‌شود (۲۵). در مطالعاتی که در زمینه تأثیر ضدلیشمانیایی داروها و عصاره‌های گیاهی در ایران و کشورهای دیگر انجام شده، اغلب از روش شمارش مستقیم به‌وسیله لام هموسایتومتر استفاده شده، که یک روش وقت‌گیر و غیردقیق می‌باشد (۲،۲۳،۲۶).

روش‌های رنگ‌سنجی (Colorimetry) که برای بررسی رشد و زنده بودن سلول بر روی پلیت‌های میکروتیتر انجام می‌شوند، فواید زیادی دارند ازجمله این که این روش‌ها، علاوه بر سهولت انجام و ارزانی، سریع، حساس و قابل اعتماد می‌باشند و همچنین فاقد هرگونه ماده رادیوایزوتوپ هستند، از این‌رو ایمن و مطمئن هستند. از طرفی این روش‌ها دارای قابلیت تکرارپذیری می‌باشند و از این‌رو امکان غربال‌گری داروها را با سهولت فراهم‌می‌کنند (۱۱،۱۷،۱۸،۲۴).

مطالعات نشان می‌دهند که فرم‌های پنج‌ظرفیتی ترکیبات آنتیموان در محیط کشت چندان مؤثر نبوده (۱۶،۲۷) و در تحقیقات متعدد نشان داده شده است که فرم سه‌ظرفیتی ترکیبات آنتیموان علیه پروماستیگوت‌های گونه‌های مختلف لیشمانیا خاصیت سمی بیشتری نسبت به فرم پنج ظرفیتی دارد (۱۵،۱۶) و همچنین نشان داده شده است که پتاسیم آنتیموان تارتارات (تارتارامتیک) که فرم سه‌ظرفیتی آنتیموان است نسبت به مگلومین آنتیمونات و هم‌چنین علیه پروماستیگوت و آماستیگوت مؤثرتر می‌باشد (۱۶،۲۸). غلظت ۵۰۰۰ µg/ml داروی کنترل که بهترین پایش را در مهار رشد انگل لیشمانیا ماژور از خود نشان داد، به عنوان ملاک مقایسه انتخاب گردید، از این‌رو مقایسه این رقت با هر کدام از غلظت‌های عصاره‌های گیاهی در این تحقیق بسیار سخت‌گیرانه بود. به عبارت دیگر، جذب نوری هر کدام از غلظت‌های عصاره‌های مشابه با کنترل، به معنی تأثیر مطلوب آن عصاره، تلقی می‌شود. میانگین جذب نوری کمتر نشان‌دهنده تأثیر بیشتر هر عصاره می‌باشد.

در این مطالعه، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها و داروی تارتارامتیک، اثر مهاری بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور افزایش می‌یابد و کاهش جذب نوری نشان‌دهنده این اثر مهاری می‌باشد. مقایسه میانگین جذب نوری عصاره‌های مورد بررسی و داروی کنترل، دارای اختلاف معنی‌داری بود که نشان‌دهنده تأثیر همه عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور بود.

نتایج این بررسی نشان داد که عصاره آویشن شیرازی دارای کمترین اثر بوده و در غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بی‌تأثیر می‌باشد و تنها در غلظت ۵۰۰۰µg/ml با داروی کنترل هم‌خوانی دارد.

در مطالعه‌ای که بر روی تأثیر مخلوط عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر درمان لیشمانیوز جلدی روستایی در مدل حیوانی (موش Balb/c) به‌صورت هم‌زمان با مطالعه حاضر انجام شده است، تأثیر نسبتا خوب عصاره مذکور در پایه ژل یا پماد مورد تأکید قرار گرفته‌است (۲۹). از طرفی عصاره مورد که بهترین تأثیر را از خود نشان داد فقط در غلظت ۳۱/۲۵µg/ml بی‌تأثیر بود و در غلظت‌های دیگر با داروی کنترل تأثیر مشابهی نشان داد، در حالی که در غلظت ۵۰۰۰µg/ml نسبت به داروی کنترل مؤثرتر بود.

نتایج IC_{50} مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره مورد که IC_{50} آن برابر ۵/۸µg/ml است تأثیر بهتری نسبت به عصاره‌های دیگر دارد و از طرفی عصاره آویشن شیرازی که IC_{50} آن برابر ۷/۴µg/ml می‌باشد کمترین تأثیر را نسبت به عصاره‌های دیگر دارد .

نتیجه‌گیری

از آنجایی که عصاره‌های گیاهی آویشن شیرازی، اسپند و مورد به صورت برون‌تنی به‌خوبی اثرات ضدلیشمانیایی از خود نشان داده‌اند، این مطالعه ضرورت استفاده ازگیاهان بومی را مورد تأکید قرار داده و انجام آزمایشات بیشتری را برای ارزیابی این عصاره‌ها بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب پیشنهاد می‌نماید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل تأمین اعتبار طرح و آقای دکتر نوذر نخعی به دلیل مشاوره آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها و همچنین آقای دکتر علی‌اکبر حق‌دوست برای انجام محاسبات IC_{50} تشکر و قدردانی می‌شود.

In vitro Evaluation of *Anti-Leishmanial* Activities of *Zataria Multiflora Boiss*, *Peganum Harmala* and *Myrtus Communis* by Colorimetric Assay

Barati M., M.Sc.,[1] Sharifi I., Ph.D.,[2*] Sharififar F., Ph.D.[3]

1. Master in Medical Parasitology, Leishmaniasis Research Center & Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Professor of Parasitology, Leishmaniasis Research Center & Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Assistant Professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author, e-mail:iraj.sharifi@yahoo.com

(Received: 9 March 2009 Accepted: 29 July 2009)

Abstract

Background & Aims: Plant extracts and plant-derived compounds are valuable sources of new medicinal agents that are commonly used to treat infectious diseases. The purpose of this study was to evaluate, *anti-Leishmanial* activity of three plant extracts on *L.major* promastigotes by colorimetric assay as compared to a trivalent antimonial compound (tartar emetic).

Methods: *Leishmania major* promastigotes were cultured at 25±2°C in stationary phase in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) and antibiotic. Then by using MTT assay, the biological activity of plant extracts in comparison to potassium antimonyl tartrate [Sb (III)] on *L.major* promastigotes were assessed. The optical density (OD) due to cleavage of the tetrazolium salt MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] into a colored product formazan by the parasite was measured using ELISA reader and IC_{50} values (50% inhibitory concentrations) were determined. All experiments were repeated in duplicate.

Results: plant extracts and Tartar emetic inhibited the growth of promastigote forms of *L.major in vitro* after 72 hours of incubation. IC_{50} of tartar emetic was 4.7 µg/ml, and IC_{50} values for *Zataria multiflora Boiss*, *Peganum harmala* and *Myrtus communis* extracts were 7.4, 7.2 and 5.8 µg/ml, respectively. Although tartar emetic was more effective than plant extracts, all extracts had profound effects on promastigotes of *L.major*.

Conclusion: Since, plant extracts of *Zataria multiflora Boiss*, *Peganum harmala* and *Myrtus communis* have *anti-Leishmanial* effects *in vitro*, further works are required to evaluate the exact effect of these extracts on *Leishmania* agents in animal models.

Keywords: *Leishmania major, Zataria multiflora Boiss*, *Peganum*, *Myrtle communis* , Plant extracts, MTT formazan

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2010; 17(1): 32-41

References

1. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* 2005; 66(17):2056-71.
2. Lamidi M, DiGiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C, Rondi ML, et al. *In vitro* cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 102(2):185-90.
3. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural

products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12(6): 514-35.

4. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5):305-18.
5. Estevez Y, Castillo D, Pisango MT, Arevalo J, Rojas R, Alban J, et al. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *J Ethnopharmacol* 2007; 114(2):254-9.
6. Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. *Indian J Med Res* 2005;121(4):407-14.
7. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006;123(3):399-410.
8. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002;8(4):319-42.
9. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 2007;5(3):150-8 [Persian].
10. Bouvier J, Etges R, Bordier C. Identification of the promastigote surface protease in seven species of Leishmania. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 24(1):73-9.
11. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int* 2005; 54(2):119-22.
12. Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 2009; 80(2): 81-90.
13. Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barria E, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. *J Microbiol Methods* 2003;55(3):813-6.
14. Samsam Shariat H. Gozideye Giyahane Darooyi. Isfahan, Mani publication, 2004. [Persian]
15. Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(9):1842-6.
16. Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(5):972-6.
17. Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen TC. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of Leishmania major promastigotes. *Parasitol Res* 1994; 80(3):235-9.
18. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2):271-7.
19. Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania spp. Res Microbiol* 2004;155(4):224-30.
20. W.H.O. Control of the leishmania: technical report series. W.H.O, 1990; p793.
21. Azadbakht M, Ziai H, Abdollahi F, Shabankhani B. Effect of essential oils of Artemistia Aucheri Bioss., Zataria Multiflora Bioss and Myrtus Communis L. on Trichomonas Vaginalis. *J Med Plants* 2003; 8(2): 35-40 [Persian].

22. Saebi E. Clinical parasitology, protozoal diseases in Iran. 4th ed., Tehran, Ayij publication, 2005; PP183-203 [Persian].

23. Jafari MR, Behravan J, Bodagh Abadi A, Ramezani M. Evaluation of Leishmanicidal effect of Euphorbia Myrsinites extract by *in vitro* anti-Leishmanial assay using Promastigote of Leishmania Major. *Iranian J Basic Med Sci* 2006; 4(8); 295-8 [Persian].

24. Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *J Microbiol Methods* 2006; 66(1):79-86.

25. Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int* 2000; 48(3):265-9.

26. Saleheen D, Ali SA, Yasinzai MM. Antileishmanial activity of aqueous onion extract *in vitro*. *Fitoterapia* 2004;75(1):9-13.

27. Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27(6):916-20.

28. Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1234-9.

29. Shirani-Bidabadi L, Mahmoudi M, Saberi S, Zolfaghar-Baghbaderani A, Nilforoushzadeh M.A, Abdoli H, et al. The effectiveness of mix extracts of Thyme, Yarrow and Propolis on Cutaneous Leishmaniasis: a comparative study in animal model (Balb/c). *Tehran Univ Med J* 2009; 66(11): 785-90 [Persian].