

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 شریفی^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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 قرار گرفت. میزان جذب نوری (Optical density) رنگ حاصله از احیاء نمک تترازولیوم (MTT) به محصول رنگی فورمازان توسط انگل، به وسیله 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 مهار کردند. میزان IC_{50} تارتارامتیک برابر با $4/7 \mu\text{g/ml}$ ، و از عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد به ترتیب $7/4$ ، $5/8$ و $7/2$ 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 قابل ملاحظه‌ای نشان دادند.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد به صورت 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 لیشتانوز و دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد گروه انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات لیشتانوز و

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

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

پدیرش مقاله: ۱۳۸۸/۵/۷

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۸/۴/۱۵

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۲/۱۸

مقدمه

لیشمانیوز مجموعه‌ای از بیماری‌های تک‌یاخته‌ای قابل انتقال بین انسان و حیوان است که در اغلب نقاط دنیا وجود دارد، به طوری 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 (۴-۶، ۱). بروز سالیانه موارد جدید در حدود 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 از جمله، مگلو مین آنتیمونات (گلو کانتیم) و سدیم استیو گلو کونات (پنتوستام) می‌باشند (۷-۹)، 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 فسفو کیناز باعث جلوگیری از تولید آدنوزین تری فسفات می‌شوند (۸).

در سال‌های اخیر، افزایش میزان مقاومت به آنتیموان‌های پنج‌ظرفیتی منجر به معرفی ترکیبات ضدلیشمانیازی جدیدی نظیر میلنفوسین، آمفوتریسین B، کتو کونازول، پارومومایسین و سایر ترکیبات شیمیایی شده است (۱۰-۱۲). در عین حال هیچ‌کدام از این داروها بدون اثرات جانبی نیستند (۱۱، ۳) و همچنین سمیت این عوامل و پایدار ماندن 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 به دلیل 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 از گیاهان 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 (۱۰، ۱۲، ۳). برخی محصولات طبیعی، به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات ضدلیشمانیازی محسوب می‌شوند (۱۰، ۱۳). به طوری 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 ضدلیشمانیازی 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 هر بار بومی آنها برای شناسایی تهیه گردید. سپس گیاهان جمع‌آوری شده در سایه خشک و بعد از آسیاب کردن با روش پرکولاسیون با متانول ۸۰٪ عصاره‌گیری شدند (۱۴). در پایان، تمام عصاره‌های به‌دست آمده با روش تقطیر در خلأ تا حد

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]) به یک محصول رنگی فورمازان نامحلول تبدیل می‌شود (۱۷-۱۹، ۱۳، ۱۱). 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 به کار می‌رود (۱۹). برای تهیه محلول MTT، ۵mg پودر MTT در ۱ml محلول PBS استریل (۵mg/ml) حل می‌شود.

اضافه کردن 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 دابل (Duplicate) اضافه شد به نحوی که در هر چاهک 5×10^5 پروماستیگوت قرار گیرد.

اضافه کردن دارو و عصاره‌ها به پلیت

در ادامه از عصاره‌های مختلف و داروی کنترل که به ترتیب 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 دابل، اضافه گردید. 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 خارج شده و به میزان ۱۰٪ حجم هر چاهک از محلول ذخیره MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که قبلاً تهیه شده‌بود ریخته شد. چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰µl محیط کشت

خشک شدن تغلیظ و تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شدند.

تهیه و آماده‌سازی انگل

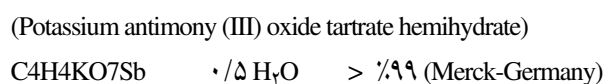
پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سوویه MRHO/IR/75/ER به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری دارای محیط کشت RPMI-1640 (Gibco-BRL) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco-BRL) که قبلاً کمپلمان آن در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شده و حاوی ۱۰۰ Iu/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (Gibco-BRL) بود منتقل و در دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ کشت داده شد.

شمارش انگل

با استفاده از لام ثوبار 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 آنتی‌مون سه‌ظرفیتی است که به صورت پودر از شرکت Merck آلمان تهیه شده که دارای فرمول زیر می‌باشد:

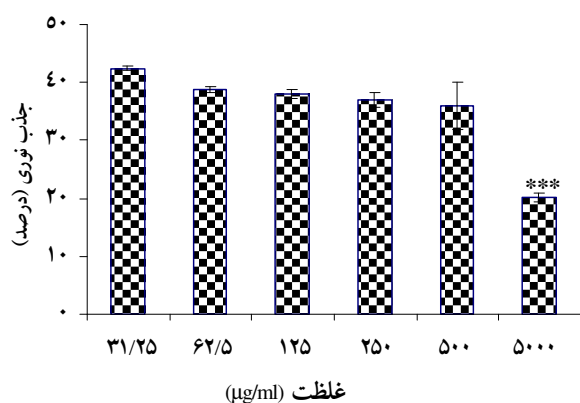


روش MTT

برای ارزیابی اثرات عصاره‌ها و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور از روش

نتایج

در این مطالعه اثر ضدلیشمانیایی سه عصاره گیاهی در مقایسه با داروی تارتارامیتیک به عنوان کنترل بررسی شد. تغییرات جذب نوری به وسیله دستگاه الایزا ریدر قرائت و روند تأثیر دارو و عصاره سنجیده شد. ابتدا اثربخشی تارتارامیتیک به تنهایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف آن (۳۱/۲۵-۵۰۰۰ μg/ml) اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$) که این اختلاف در آزمون Post Hoc مربوط به اختلاف در غلظت ۵۰۰۰ μg/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 معنی‌داری بین غلظت ۵۰۰۰ μg/ml با سایر غلظت‌ها مشاهده شد ($P < 0/001$).

با توجه به این که غلظت ۵۰۰۰ μg/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 ۵۰۰۰ μg/ml داروی کنترل استفاده شد و نتایج آن به صورت جدول و نمودار رسم گردید.

و فقط ۱۰ μl از محلول MTT می‌باشد. متعاقباً پلیت‌ها به مدت ۳-۴ ساعت در دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ انکوبه شدند. بعد از مدت زمان انکوباسیون، پلیت‌ها از انکوباسیون بیرون آورده شدند و کریستال‌های فورمازان با حجمی معادل محیط کشت اولیه یعنی معادل ۱۰۰ μl به هر چاهک از محلول ایزوپروپانل اسیدی (اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در ایزوپروپانل خالص) جهت حل کردن رنگ، افزوده و رنگ حاصله در طول موج ۴۹۲ nm با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader) قرائت شد و جذب نوری به دست آمده، برای تعیین میزان IC_{50} (Inhibitory concentrations 50%) که غلظتی از عصاره است که از رشد ۵۰٪ ارگانسیم 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 $P < 0/05$ 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) به دست آمده براساس فرمول زیر میزان IC_{50} با نرم‌افزار EXCEL محاسبه گردید:

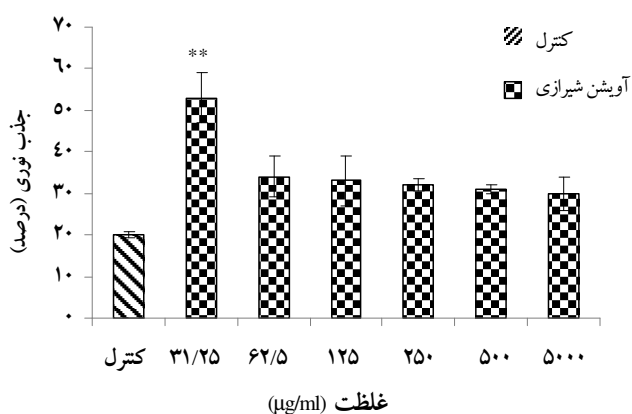
$$\text{Log}(IC_{50}) = \log(x_1) + [(y_1 - y_0/2) / (y_1 - y_2)] [\log(x_2) - \log(x_1)].$$

در فرمول فوق y_1 مقدار انگل در غلظت 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.

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها

آویشن شیرازی

مقایسه تأثیر عصاره آویشن شیرازی و داروی کنترل نشان داد که میانگین جذب نوری بین آنها دارای اختلاف معنی دار می‌باشد ($P < 0/05$) به طوری که در غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ به طور معنی داری ($P < 0/01$) میانگین جذب نوری بالاتری وجود داشت در حالی که بین سایر غلظت‌ها و داروی کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۲).



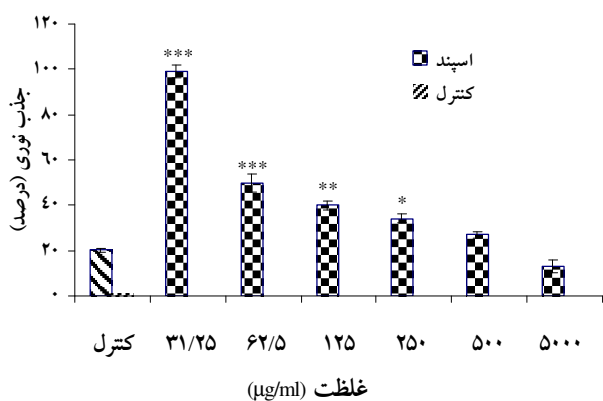
نمودار ۲. مقایسه میانگین جذب نوری عصاره آویشن شیرازی و

داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

کنترل: داروی تارتامیتیک $P < 0/01$ (**).

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 معنی دار است ($P < 0/001$). این عصاره در غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ به طور معنی داری ($P < 0/001$) میانگین جذب نوری بالاتر و در غلظت‌های $5000 \mu\text{g/ml}$ به طور معنی داری ($P < 0/05$) میانگین جذب نوری کمتری و در غلظت‌های 500 ، 250 ، 125 ، $62/5$ و 250 میکروگرم در میلی‌لیتر جذب نوری مشابه با کنترل، نشان داد (نمودار ۴).



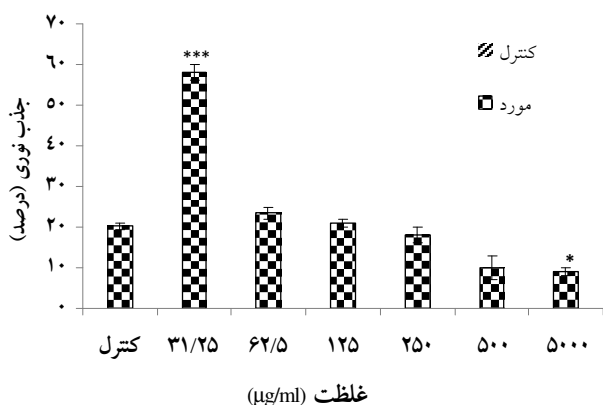
نمودار ۳. مقایسه میانگین جذب نوری عصاره اسپند و داروی

کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

$P < 0/001$ (***) و $P < 0/01$ (**)* و $P < 0/05$ (*). کنترل: داروی تارتامیتیک

اسپند

تأثیر غلظت‌های مختلف این عصاره در مقایسه با داروی کنترل، اختلاف معنی دار نشان داد ($P < 0/001$) به طوری که در غلظت‌های $31/25$ ، $62/5$ ، 125 و 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت معنی داری (به ترتیب $P < 0/001$ ، $P < 0/001$ ، $P < 0/01$ و $P < 0/05$) میانگین جذب نوری بالایی وجود داشت در حالی که در سایر غلظت‌ها از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۳).



نمودار ۴. مقایسه میانگین جذب نوری عصاره مورد و داروی کنترل

بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

$P < 0/001$ (***) و $P < 0/05$ (*) کنترل: داروی تارتامیتیک

کوهی و همچنین گیاه مورد و آویشن شیرازی بر تریکوموناس واژینالیس می باشد (۲۱). در طب محلی نیز از غوزه پنبه به صورت موضعی برای درمان سالک استفاده می شده است (۲۲). از طرفی اثرات ضدلیشمانیایی برخی از گیاهان دارویی نیز بر روی پروماستیگوت های انگل، بررسی شده است (۲۳).

آزمایش هایی که در حال حاضر برای بررسی داروها و ترکیبات ضدلیشمانیایی به کار برده می شوند، دارای محدودیت های فراوانی می باشند، از جمله این که، خطرناک هستند، نیاز به پیش سازهای رادیواکتیو از قبیل ^3H -تیمیدین دارند و یا بسیار پر زحمت و وقت گیر می باشند (۲۴، ۱۱). برای تعیین زنده بودن (Viability) پروماستیگوت های لیشمانیا تاکنون چندین روش ابداع و معرفی شده است که شامل شمارش سلول های زنده، اندازه گیری فعالیت آنزیمی و واکنش احیای نمک تترازولیوم می شود (۲۵). در مطالعاتی که در زمینه تأثیر ضدلیشمانیایی داروها و عصاره های گیاهی در ایران و کشورهای دیگر انجام شده، اغلب از روش شمارش مستقیم به وسیله لام هموسایتومتر استفاده شده، که یک روش وقت گیر و غیردقیق می باشد (۲۶، ۲۳، ۲).

روش های رنگ سنجی (Colorimetry) که برای بررسی رشد و زنده بودن سلول بر روی پلیت های میکروتیتر انجام می شوند، فواید زیادی دارند از جمله این که این روش ها، علاوه بر سهولت انجام و ارزانی، سریع، حساس و قابل اعتماد می باشند و همچنین فاقد هر گونه ماده رادیوایزوتوپ هستند، از این رو ایمن و مطمئن هستند. از طرفی این روش ها دارای قابلیت تکرارپذیری می باشند و از این رو امکان غربال گیری داروها را با سهولت فراهم می کنند (۲۴، ۱۸، ۱۷، ۱۱).

علاوه بر آنالیز آماری، IC_{50} (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد ۵۰٪ از انگل ها می شود) نیز برای هر کدام از عصاره ها و داروی کنترل محاسبه شد. در روش MTT با تأثیر عصاره ها و داروی کنترل بر روی مرحله پروماستیگوت لیشمانیا ماژور، IC_{50} برابر $5/8-7/4 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد. به طوری که IC_{50} داروی کنترل $4/7 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد که نشانگر تأثیر تارتارامتیک در غلظت $4/7 \mu\text{g/ml}$ است. همچنین IC_{50} هر کدام از عصاره ها به صورت جداگانه محاسبه و IC_{50} عصاره آویشن شیرازی برابر با $7/4 \mu\text{g/ml}$ ، عصاره اسپند برابر با $7/2 \mu\text{g/ml}$ و عصاره مورد $5/8 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میزان IC_{50} داروی کنترل و عصاره های آویشن شیرازی، اسپند و مورد بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

داروی کنترل و عصاره های گیاهی	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
تارتارامتیک	۴/۷
آویشن شیرازی	۷/۴
اسپند	۷/۲
مورد	۵/۸

بحث و نتیجه گیری

لیشمانیوز به عنوان یک مشکل بهداشتی در اکثر کشورهای جهان به ویژه در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ایران، محسوب می شود. 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 (۲۰، ۴، ۵).

در ایران در زمینه اثرات ضد تک یاخته ای گیاهان دارویی، تحقیقات وسیعی انجام شده است که از جمله آنها، بررسی اثرات ضد مالاریایی و ضد تریکومونایی درمنه

در مطالعه‌ای که بر روی تأثیر مخلوط عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر درمان لیشمانیوز جلدی روستایی در مدل حیوانی (موش Balb/c) به صورت هم‌زمان با مطالعه حاضر انجام شده است، تأثیر نسبتاً خوب عصاره مذکور در پایه ژل یا پماد مورد تأکید قرار گرفته است (۲۹). از طرفی عصاره مورد که بهترین تأثیر را از خود نشان داد فقط در غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ بی‌تأثیر بود و در غلظت‌های دیگر با داروی کنترل تأثیر مشابهی نشان داد، در حالی که در غلظت $5000 \mu\text{g/ml}$ نسبت به داروی کنترل مؤثرتر بود.

نتایج IC_{50} مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره مورد که IC_{50} آن برابر $5/8 \mu\text{g/ml}$ است تأثیر بهتری نسبت به عصاره‌های دیگر دارد و از طرفی عصاره آویشن شیرازی که IC_{50} آن برابر $7/4 \mu\text{g/ml}$ 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 از گیاهان 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.

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 پنج‌ظرفیتی دارد (۱۵،۱۶) و همچنین نشان داده شده است که پتاسیم آنتیموان تارتارات (تارتارامتیک) که فرم سه‌ظرفیتی آنتیموان است نسبت به مگلو مین آنتیمونات و همچنین علیه پروماستیگوت و آماستیگوت مؤثرتر می‌باشد (۱۶،۲۸). غلظت $5000 \mu\text{g/ml}$ داروی کنترل که بهترین پایش را در مهار رشد انگل لیشمانیا مازور 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 مازور 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 مازور بود.

نتایج این بررسی نشان داد که عصاره آویشن شیرازی دارای کمترین اثر بوده و در غلظت‌های $31/25$ ، $62/5$ ، 125 ، 250 و 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر بی‌تأثیر می‌باشد و تنها در غلظت $5000 \mu\text{g/ml}$ با داروی کنترل هم‌خوانی دارد.

***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 IC₅₀ 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. IC₅₀ of tartar emetic was 4.7 µg/ml, and IC₅₀ 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, Eyle 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 *Artemisia 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].