

بررسی اثرات سینرژیستی مخلوط سه عصاره گیاهی بومادران، افسنتین و برگ گردو بر انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/TR/75/ER) در شرایط آزمایشگاهی

نرگس یکتایان^{۱*}، محمود رفیعیان^۲، بهمن خلیلی دهکردی^۳، سید حسین حجازی^۴، لیلا شیرانی بیدآبادی^۵،
سید عبدالله حسینی^۱

- ۱- کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد
 - ۲- دکترای فارماکونوزی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد
 - ۳- دکترای انگل‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد
 - ۴- دکترای انگل‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
 - ۵- کارشناسی ارشد حشره‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه طاهره (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
- *آدرس مکاتبه: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی
تلفن: ۳۳۳۴۶۹۱ (۰۳۸۱)، نمابر: ۳۳۳۰۷۰۹ (۰۳۸۱)
پست الکترونیک: nargesyekta20@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۰/۱۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۲۲

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز از مشکلات مهم سیستم‌های بهداشتی می‌باشد. به دلیل عوارض جانبی داروهای مورد استفاده در درمان این بیماری‌ها و همچنین تمایل مردم به استفاده از داروهای گیاهی، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی سه گیاه بومادران، افسنتین و برگ گردو بر انگل لیشمانیا ماژور و بررسی اثر سینرژیست مخلوط سه عصاره در محیط *In vitro* طراحی و اجرا شد.
هدف: دسترسی به فرمولاسیون دارویی فاقد مواد شیمیایی مضر و بدون عوارض جانبی و مؤثر.
روش بررسی: بر اساس هدف مطالعه عصاره هر سه گیاه با غلظت‌های ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند. سپس این غلظت‌ها در محیط‌های حاوی انگل در حلال بافر PBS به علاوه DMSO دو درصد تزریق شدند و در زمان‌های ساعت صفر، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ از نظر تعداد انگل مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند.
نتایج: در بررسی تأثیر عصاره‌ها بر انگل‌ها مشخص شد عصاره گیاهان باعث افزایش بی‌حرکتی انگل‌ها شده است که این عدم تحرک ارتباط مستقیم با زمان داشته است. به نحوی که گلوکاتیم بعد از ۲۴ ساعت و آمفوتریسین B بعد از ۳۰ دقیقه در مقایسه با تأثیر عصاره گیاهان که طی ۲۴ ساعت باعث نابودی انگل‌ها شدند.
نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب عصاره سه گیاه ذکر شده بر روی انگل لیشمانیا مؤثر بوده است. هرچند مطالعات بیشتر برای نشان دادن این تأثیر در حیوانات آزمایشگاهی و بیماران داوطلب ضروری به نظر می‌رسد.
کلواژگان: لیشمانیا، بومادران، افسنتین، برگ گردو



مقدمه

لیشمانیوز به طیفی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که عامل آن گونه‌های مختلف لیشمانیا می‌باشد. عامل بیماری، تک یاخته‌ای به نام لیشمانیا از راسته *Kinetoplastida* است، که برحسب محیط زندگی به دو شکل بدون تازک یا جسم لیشمن و تازکدار دیده می‌شود. این انگل در بدن مهره‌داران، در داخل سلول‌های بیگانه خوار تک هسته‌ای زندگی می‌کند و تکثیر می‌یابد. لیشمانیاها عمدتاً توسط گونه‌های پشه خاکی منتقل می‌شوند [۱]. تخمین زده می‌شود که در حدود ۱۲ میلیون مورد لیشمانیوز جلدی در نقاط مختلف جهان وجود داشته باشد و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به این بیماری قرار دارند. در حال حاضر ۸۸ کشور جهان به لیشمانیوز جلدی مبتلا هستند در ایران میزان بروز لیشمانیوز جلدی به طور متوسط حدود ۳۵ درصد هزار نفر جمعیت است [۲]. استفاده فراورده‌های دارویی با منشاء گیاهی به دلایل مختلفی مانند کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار به علت توصیه طب سنتی و استفاده نسل‌های گذشته و قیمت کمتر گیاهان دارویی و همچنین سازگاری بیشتر با عملکرد فیزیولوژیک طبیعی بدن انسان گسترده‌تر شده است [۳]. در این میان برخی از گیاهان مانند برگ گردو، بومادران و افسنتین در طب سنتی مصرف فراوان دارند که مطالعات متعددی پیرامون خواص ضد میکروبی آنها صورت گرفته است [۴-۷]. بنابراین تصمیم بر آن شد که در این تحقیق اثرات سه گیاه فوق بر روی لیشمانیا و تریکوموناس مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گیرد. بومادران یکی از گیاهان متعلق به خانواده *Astraceae* است. در حقیقت این گیاه از مشهورترین گیاهان دارویی است که به فراوانی در طب کهن برای درمان بیماری‌ها به طور عام و زخم‌ها و سوختگی‌ها به طور خاص مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۸]. مهم‌ترین ترکیبات موجود در این بخش شامل روغن فرار، ترکیبات پلی فنولی، برخی انواع فلاونوئیدها، لاکتون‌ها، بتائین‌ها، ترکیبات استیلن، رزین، تانن، آشیلین، فسفات، نترات، نمک‌های پتاسیم و اسیدهای آلی است. مطالعات انجام شده روی این گیاه

نشان‌دهنده اثرات ضد تشنجی [۹]، ضد التهابی [۱۰]، ضد اسپاسمی [۱۱]، آنتی باکتریال، ضد قارچ [۱۴-۱۲]، ضد درد [۱۵]، کاهش دهنده فشار خون [۱۶]، کاهش دهنده چربی خون، ضد آریتمی قلبی [۱۷] و آنتی اکسیدان گیاه می‌باشد [۱۸]. گردو گیاهی از خانواده *Juglandaceae* و جنس *Juglans regia* است. عصاره برگ درخت گردو خاصیت میکروب‌کشی و باکتری‌کشی دارد. برگ و پوست گردو مقوی و تصفیه‌کننده خون است. برگ‌ها و پوست آن به خصوص به خاطر ماده تلخ و تانن آن در مداوای بیماری‌های جلدی و خنازیر مفید واقع می‌شوند. برگ گردو برای شست و شوی زخم‌ها و التیام آنها بسیار مفید و جوشانده برگ درخت گردو درمان کننده سردرد، سرمازدگی و بیماری‌های پوستی است. برگ تازه درخت گردو حشرات موزی مانند بید و ساس را از بین می‌برد. چون مغز گردو دارای مس می‌باشد بنابراین به جذب آهن در بدن کمک می‌کند، همچنین جوشانده برگ یا پوست سبز گردو برای تجویز درمان کم‌خونی و ضعف است [۱۹]. مشتقات گیاهی تهیه شده از گردو در درمان موضعی آکنه، بیماری‌های التهابی، کچلی و عفونت‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی به کار می‌رود. خواص ضدباکتریایی، قارچی و ویروسی این گیاه به واسطه وجود ترکیب شیمیایی ۵-هیدروکسی ۱ و ۴ نفتوکوتینون موجود در آن بوده که باعث ایجاد سیکل احیا و واکنش با گلوکوتایون می‌شود [۲۰]. افسنتین معروف به *Wormwood* از خانواده گل مرکبانی می‌باشد که به علت دارا بودن خواصی از جمله حشره‌کشی، اشتهاآوری، زدودن کرم روده و همچنین داشتن ترکیبات تلخ و معطر از قدیم‌الایام در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. امروزه اسانس به دست آمده از افسنتین در معطر کردن برخی غذاها و نوشیدنی‌ها، در داروسازی، کشاورزی و یا به عنوان ضدباکتری، ضدتب، ضدباروری، ضد مالاریا و تقویت‌کننده قلب و عروق کاربرد دارد و همچنین به علت وجود ترکیبات سمی در گیاه جهت تهیه حشره‌کش و کنه‌کش گیاهی از آن استفاده می‌شود [۲۱]. افسنتین از مهم‌ترین ترکیبات گیاهی مؤثر در درمان



یکتاییان و همکاران

تهیه و کشت انگل لیشمانیا

سویه استاندارد لیشمانیا ماژور با کد MRHO/IR/75/ER پروماستیگوت از بخش انگل‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد تهیه گردید. پس از ذوب کردن به محیط استوک Navy Mack Neal Nicole (NNN) منتقل شده تا به حد کفایت رشد کند. جهت انبوه‌سازی به محیط RPMI-1640 به همراه آنتی‌بیوتیک انگل انتقال یافت و به فاصله ۴ - ۳ روز کشت مکرر انجام شد. پس از تولید انبوه در مرحله ایستا و انتقال به محیط تازه به همراه ۱۰ درصد گلیسرول در ویال‌های مناسب تقسیم و به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و پس از آن در ۱۹۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

گروه‌های مربوط به بررسی انگل لیشمانیا

- ۱- محیط حاوی گلوکانتیموم تنها ($MIC^{(۱۳)} = 10 \mu g/ml$) و انگل لیشمانیا حل شده در حلال بافر PBS به علاوه DMSO دو درصد (کنترل -)
- ۲- محیط حاوی آمفوتریسین B تنها ($MIC^{(۱۴)} = 0.7 \mu g/ml$) و انگل لیشمانیا حل شده در حلال بافر PBS به علاوه DMSO دو درصد (کنترل -)
- ۳- محیط حاوی انگل لیشمانیا تنها حل شده در حلال بافر PBS به علاوه DMSO دو درصد (کنترل +)
- ۴- محیط حاوی انگل لیشمانیا تنها (شاهد)
- ۵- محیط کشت لیشمانیا و عصاره هر یک از سه گیاه با غلظت‌های ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شده در حلال بافر PBS به علاوه DMSO دو درصد
- ۶- محیط کشت لیشمانیا و عصاره هر یک از سه گیاه به صورت دو به دو با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شده در حلال بافر PBS به علاوه DMSO دو درصد جهت شمارش انگل‌ها از لام نئوبار استفاده شد. تمامی محیط‌ها در ابتدای کشت (ساعت صفر) و سپس در ساعات ۷۲، ۴۸، ۲۴، ۶ از نظر زنده ماندن و تحرک انگل بررسی شدند.

مالاریا در طب قدیم بوده است. از طرفی این گیاه در درمان سیستوزوما اثر پروفیلاکسی داشته و در چین و آفریقا در درمان کلونورکیس نیز به کار می‌رفته است. ممانعت از رشد توکسوپلازما گوندی و درمان لیشمانیا نیز از کاربردهای مهم افسنتین محسوب می‌شود. همچنین خاصیت ضدقارچی (آسپرژیلوس فومیگاتوس) و ضد میکروبی آن (ضدلپتوسپیرا) به اثبات رسیده است [۲۲]. مهم‌ترین قسمت گیاه که خاصیت درمانی دارد گل‌های آن می‌باشند. از ترکیبات مؤثره موجود در عصاره این گیاه می‌توان از ترکیبات معطر، مونوترپن و کتون که خاصیت ضدالتهاب و ضد میکروبی دارد، مانند اوکالیپتول، مایر سین، لینالول، کاریوفیل، پنین، کافور، بومیل استات، لیمونن، سابینیل استات، سیس کریزاننتیل، سیس اوپوکسی اوسیمن، بورنیل استات، ترکیبات تلخ و سمی مانند کاماجولین و توجون را نام برد [۲۳، ۲۴].

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاهان

خار و خاشاک و قسمت‌های غیرقابل استفاده از گیاهان تهیه شده جدا و پس از تمیز کردن، در سینی‌های مخصوص و در درجه حرارت اتاق و در سایه خشک و با آسیاب الکتریکی خرد و از الک شماره ۱۰ عبور داده شد. پودر به دست آمده به نسبت یک به سه با الکل اتیلیک ۸۰ درجه مخلوط شده، تا حدی که ۳ - ۲ سانتی‌متر روی پودر را پوشاند. محلول حاصل در مدت خیساندن، هر چند ساعت یک بار به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر تکان داده شد تا مواد مؤثره آن بهتر خارج شود. بعد از ۷۲ ساعت این محلول از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. این عمل دو مرتبه هر دفعه به مدت ۲۴ ساعت تکرار شد. محصول حاصل تا حد خروج تمام الکل با دستگاه تبخیر در خلاء دوار تقطیر و در حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و جهت خشک شدن در آن ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. عصاره بومادران، افسنتین و برگ گردو به دست آمده آماده بهره‌برداری در مراحل بعدی شد.



روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

بومادران، افسنطین و برگ گردو بود که پس از تزریق این غلظت‌ها و بررسی تعداد انگل‌ها در زمان‌های مختلف مشخص شد که تنها اثر ترکیبی عصاره بومادران و افسنطین بر روی انگل لیثمانیا در مقایسه با محیط شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار بوده و تأثیر سایر ترکیب‌ها معنی‌دار نبوده است.

در شکل شماره ۱ نمودار IC_{50} عصاره بومادران ارائه شده است و همان‌طور که مشاهده می‌شود غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این گیاه پس از ۲۴ ساعت تقریباً نیمی از انگل‌های لیثمانیا را از بین برده است. که بر این اساس در بررسی اثر سینرژیست عصاره گیاهان مورد بررسی در این مطالعه بر روی انگل لیثمانیا از غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گیاه بومادران استفاده شده است.

در شکل شماره ۲ نمودار IC_{50} عصاره گیاه افسنطین ارائه شده است و بر این اساس غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه افسنطین در مدت زمان ۲۴ ساعت نیمی از انگل‌های لیثمانیا را از بین برده است. لذا در بررسی اثر سینرژیست ترکیب عصاره هر سه گیاه در این مطالعه برای گیاه افسنطین این غلظت به کار رفته است.

شکل شماره ۳ نمودار IC_{50} عصاره برگ گردو را نشان می‌دهد و همان‌طور که مشاهده می‌شود نیمی از انگل‌های لیثمانیا در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این گیاه پس از ۲۴ ساعت از بین رفته‌اند. که بر این اساس در بررسی اثر سینرژیست عصاره گیاهان مورد بررسی در این مطالعه بر روی انگل لیثمانیا از غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای برگ گردو استفاده شده است.

با توجه به اندازه‌گیری متغیرهای کمی مورد بررسی در زمان‌های متوالی، از روند GLM Repeated Measure ANOVA که یک مقایسه درون گروهی (within group) است، استفاده شد. از هم‌زمان این دو آزمون و با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد.

نتایج

تأثیر عصاره گیاهان مورد مطالعه بر انگل لیثمانیا به صورت خلاصه در جدول شماره ۱ گزارش شده است. آزمون آنالیز واریانس مشاهدات تکرار شده نشان داد روند کاهش معنی‌داری در تعداد انگل‌های لیثمانیا بر حسب زمان وجود دارد ($p < 0/05$) که نشان‌دهنده تأثیر عصاره گیاهان بر کاهش تعداد انگل‌های لیثمانیا می‌باشد. همچنین این آزمون نشان داد که عصاره گیاهان تأثیرات متفاوتی داشته‌اند ($p < 0/05$). آزمون مقایسات چندگانه نشان داد که گیاه برگ گردو تأثیر کمتری نسبت به گیاه بومادران داشته است ($p < 0/05$). ولی دو گیاه بومادران و افسنطین تأثیر یکسانی داشته‌اند ($p > 0/05$).

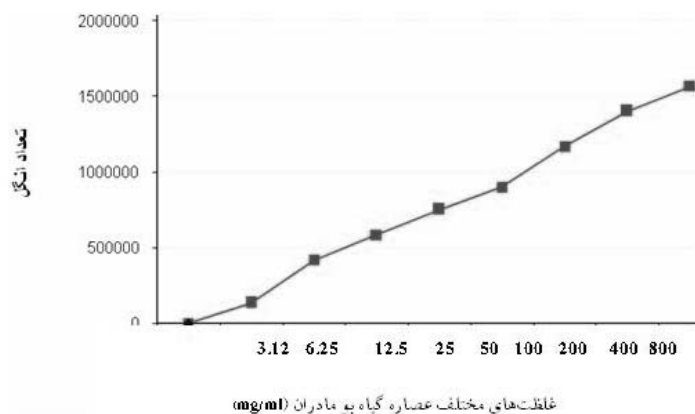
در جدول شماره ۱ میانگین تعداد لیثمانیا در زمان‌های مورد بررسی در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ترکیبی عصاره هر سه گیاه مورد بررسی در این مطالعه را نشان می‌دهد. همان‌طور که پیشتر ذکر شد با توجه به نمودارهای IC_{50} به دست آمده غلظت‌های مورد استفاده در این قسمت شامل غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای هر سه گیاه

جدول شماره ۱- میانگین تعداد انگل‌های لیثمانیا در زمان‌های مورد بررسی در محیط‌های کشت حاوی ترکیب عصاره هر سه گیاه مورد مطالعه

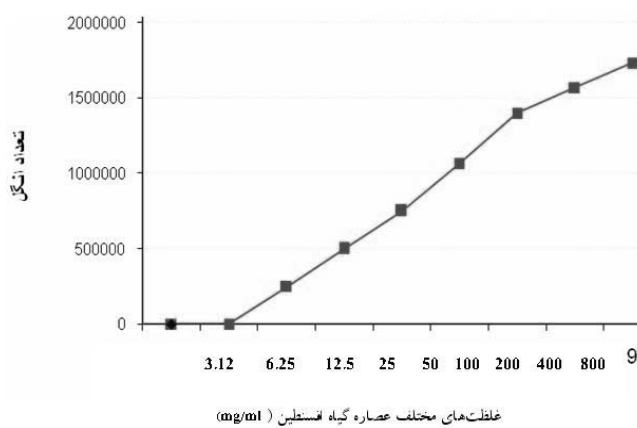
P-value	ساعت ۷۲	ساعت ۴۸	ساعت ۲۴	ساعت ۶	ساعت صفر	ترکیب عصاره‌ها
۰		۰	$12/3 \pm 12/6$	$33/3 \pm 14/4$	$20/67 \pm 81/4$	بومادران + افسنطین
$41/7 \pm 28/9$		$66/7 \pm 28/9$	90 ± 26	$120/3 \pm 26/4$	$20/67 \pm 81/4$	بومادران+برگ گردو
$66/7 \pm 28/9$		90 ± 26	$116/7 \pm 28/9$	$156/7 \pm 40/4$	$20/67 \pm 81/4$	برگ گردو + افسنطین
90 ± 26		$116/7 \pm 28/9$	$140 \pm 52/9$	$190 \pm 52/9$	$20/67 \pm 81/4$	عصاره هر سه گیاه

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده‌اند. تمامی نتایج $\times 10^4$

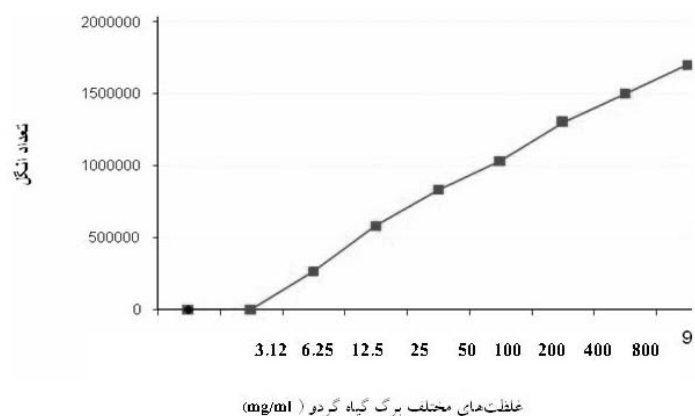




نمودار شماره ۱- نمودار IC_{50} تأثیر عصاره گیاه بو مادران در غلظت‌های مختلف بر روی انگل لیشمانیا



نمودار شماره ۲- نمودار IC_{50} تأثیر عصاره گیاه افسنتین در غلظت‌های مختلف بر روی انگل لیشمانیا



نمودار شماره ۳- نمودار IC_{50} تأثیر عصاره گیاه برگ گردو در غلظت‌های مختلف بر روی انگل لیشمانیا



بحث

داشته‌اند ($p < 0/05$) و مشخص شد که گیاه برگ گردو تأثیر کمتری نسبت به گیاه بومادران داشته است ($p < 0/05$). ولی دو گیاه بومادران و افسنطین تأثیر یکسانی داشته‌اند ($p < 0/05$). ساویا (Savoia) و همکاران تأثیر مواد مختلف از جمله بره موم را بر رشد انگل لیشمانیا ماژور در *In-vitro* بررسی و آثار درمانی غلظت‌های مختلف آنرا بر لیشمانیا مشاهده نمود [۲۵].

موستونین (Mustonen) و همکاران در تحقیقی به نقش بره موم در کشتن آماسیگوت‌های لیشمانیا دونوانی از طریق آزاد شدن اسید نیتریک و فاکتور نکروزدهنده تومور از ماکروفاژها در *In vitro* اشاره کرده‌اند [۲۶]. کلینگاردت (Klinghardt) و همکاران به نقش بره موم در مهار بیماری‌های پرتوزوئری همچون تریکوموناس، آمیبیاز، توکسوپلاسموز و ژیاودیوز اشاره کرده‌اند [۲۷]. شیرانی و همکاران با بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی آویشن، بومادران و بره موم در بهبود زخم‌های ناشی از انگل لیشمانیا، مؤثر بودن این عصاره‌ها را در بهبود زخم‌ها گزارش کرده‌اند [۷]. نتایج مطالعه درودگر و همکاران با بررسی تأثیر اسانس گیاه درمنه (*Artemisia sieberi*) بر زخم‌های حاصل از لیشمانیا ماژور در موش نشان داد که بهبودی کامل بعد از پایان دوره ۳۰ روزه درمان در هیچ‌کدام از موش‌های تحت درمان با غلظت‌های مورد بررسی درمنه مشاهده نشد و آزمایش‌های میکروسکوپی نمونه‌های گرفته شده از موش‌های مورد بررسی مثبت بود. اسانس درمنه در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد در درمان زخم لیشمانیا ماژور مؤثر نمی‌باشد و امولسیون گیاهی درمنه در کاهش قطر زخم‌ها و کاهش معنی‌دار اجسام لیژمن زخم موش‌ها پس از پایان دوره درمانی بی‌تأثیر بود [۲۸].

نتایج مطالعه آسمار و همکاران نشان داد که عصاره تخلیص شده گیاه وینکا در غلظت‌های مختلف باعث کاهش قابل توجهی در تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود. همچنین استفاده از این عصاره تخلیص شده در فاز کلروفومی به صورت تزریقی در جلوگیری از پیشرفت زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش‌های Balb/c در مقایسه با شاهد تیمار نشده بسیار مؤثر بوده به طوری که از نظر آماری دارای

افزایش مشاهده در تعداد انگل‌های لیشمانیا در بررسی محیط شاهد (بدون وجود عصاره بومادران) معنی‌دار بود. در حالی‌که بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه بومادران بر روی انگل لیشمانیا مشخص کرد که تمامی غلظت‌های بررسی شده این عصاره باعث کاهش تعداد انگل‌های لیشمانیا شده است که در مقایسه این غلظت‌ها با محیط شاهد با توجه به نتایج به دست آمده اثر کاهشی غلظت‌های ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$). در سایر غلظت‌ها (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱) کاهش تعداد انگل‌ها با توجه به محیط شاهد معنی‌دار نبوده است ($p > 0/05$). در بررسی تأثیر عصاره برگ گردو بر انگل لیشمانیا در محیط شاهد (بدون وجود عصاره برگ گردو) در تعداد انگل‌ها افزایش مشاهده شده بود که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود. در غلظت‌های (۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵) عصاره باعث کاهش تعداد انگل‌های لیشمانیا شده است که از نظر آماری و در مقایسه این غلظت‌ها با محیط شاهد با توجه به نتایج به دست آمده تنها اثر کاهشی غلظت‌های ۸۰۰، ۴۰۰ و ۲۰۰ در مقایسه معنی‌دار می‌باشد. ($p < 0/05$) و در سایر غلظت‌ها (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱) کاهش تعداد انگل‌ها در مقایسه با محیط شاهد معنی‌دار نبوده است ($p > 0/05$).

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه افسنطین بر روی انگل لیشمانیا مشخص شد تمامی غلظت‌های این عصاره باعث کاهش تعداد انگل‌های لیشمانیا شده است که تمامی این تأثیرات از نظر آماری و در مقایسه با محیط اثر کاهشی غلظت‌های ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ معنی‌دار می‌باشد. ($p < 0/05$) و در سایر غلظت‌ها (۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱) کاهش تعداد انگل‌ها با توجه به محیط شاهد معنی‌دار نبوده است ($p > 0/05$). در مقایسه تأثیر عصاره گیاهان مورد مطالعه بر انگل لیشمانیا روند کاهشی معنی‌داری در تعداد انگل‌ها بر حسب زمان مشاهده شد ($p < 0/05$) که نشان‌دهنده تأثیر عصاره گیاهان بر کاهش تعداد انگل‌های لیشمانیا می‌باشد. همچنین نشان داده شده که عصاره گیاهان تأثیرات متفاوتی



انگل‌ها داشت و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$) [۳۰]. در سه مطالعه ذکر شده فوق گیاهان مختلفی بر روی انگل لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفته شده و تأثیر این گیاهان بر لیشمانیا معنی‌دار بوده است. همانند مطالعه حاضر که تأثیر سه گیاه بومادران، افسنتین و برگ گردو بر انگل لیشمانیا معنی‌دار بود. ($p < 0/05$).

تشکر و قدرانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شده است.

اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) می‌باشد [۲۹]. نتایج مطالعه طلاری و همکاران با عنوان تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Hedera Helix* و گلوکانتیم بر عامل لیشمانیوز احشایی در *In vitro* نشان داد که در تمام لوله‌های شاهد طی روزه‌های مطالعه انگل‌ها زنده بودند اما درصد انگل‌های زنده و زمان زنده بودن آنها در غلظت‌های مختلف گلوکانتیم متفاوت بود. به گونه‌ای که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن پس از یک روز فقط ۲/۵ درصد آنها را از بین برد و در غلظت‌های ۲۵ میلی‌گرم عصاره گیاه عشقه پس از یک روز کلیه انگل‌ها از بین رفتند. در این مطالعه غلظت‌های مختلف گیاه عشقه نسبت به غلظت‌های مشابه گلوکانتیم اثر کشندگی بیشتری بر روی

منابع

1. Azizi M et al. Common Disorders in Iran. Second Edition. Khosravi Publications. Winter 1384.
2. Droudgar A, Mahbobi S, Nematyan M, Sayah M., Droudgar M. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Kashan city in 1386. *Koomesh*. Spring 1388; 10 (3): 177 - 83. [Persian].
3. Corns CM, Herbal remedies and clinical biochemistry. *Hum. Psychopharmacol; Mumtaz scan Pharmaceutical Biology* 2003; 41 (8): 608 – 13.
4. Cowan MM, Plant products as antimicrobial agent. *Clinical microbiology reviews. Clin. Microbiol Rev.* 1999; 12 (4): 564 - 82.
5. Azadbakht M, Classification of herbal medicines. Teimorzadeh Publications. Tayeb publication. First printing. Spring 1387, p: 58.
6. Pereira J A, Oliveira A I, Sousa A, Valenta P ,Paula B. compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicol.* 2007; (45): 2287 – 95.
7. Shirani-Bidabadi L, Mahmoudi M, Saberi S, ZolFaghari A, Nilforoushzadeh MA, Abdoli H, Moatar F, Hejazi SH, The Effectiveness of Mix Extracts of Thyme, Yarrow and Propolis on Cutaneous Leishmaniasis: A Comparative Study in Animal Model (Balb/c). *Tehran University Medical Journal (TUMJ)* February 2009; 66 (11): 785 - 90. [Persian].
8. Chevallir A. The encyclopedia of medicinal plants. London: Darling Kindersley 1995, pp: 102 -5.
9. Heidari MR, Ebrahim S, Mehrabani M, pardakhti A, VafaZadeh J. [Effects of methanolic extract of *Achillea wilhemsii* Koch on seizure induced by picrotoxin in mice. *Journal of Babol University of Medical Sci.* 1384; 28 (7); 7 - 13. [Persian].
10. Rashidi Tehran Moghadam M, Mozaffari AR, Study of anti-inflammatory and healing effects of *Achillea illefolium* in the treatment of Indomethacin-induced gastric ulcer in rat. *Journal of Babol University of Medical Sci.* 2005; 8 (4); 9 - 13. [Persian].
11. Karamenders C, Apaydin S. Antispasmodic effect of *Achillia nobilis* L Subsp *Sipylea* (O.Schwarz) Bassaler on the rat isolated duodenum. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 84 (2 - 3); 175 - 9.
12. Magiatis P, Skaltsounis AL (chinovL), Haroutounian SA. Chemical composition and in



vitro antimicrobial activity of the essential oils of three greek. *Achillia Spices* 2002; 57: 287 - 90.

13. Abbasoglu U, kusmenolgu S. Antibacterial and antifungal studies on Achillia L. SPICES. Gazi University Eczacilik Fakultesi Dergisi 1994, 3177 -81 (in Spain).

14. Ayatollahi Mousavi SA, Abdollahi H, Kazemipour N. Investigation of antifungal activity of 10 methanol extracts of medecinal herbs. *Journal of Kerman University of Medical Sci.* 1997; 3: 9 - 13. [Persian].

15. Arzi A & Akhavan M. The effect of hydroalcolic extract of *Achillia millefolium* on analgesic effect of Morphin in rat. *Journal of Babol University of Medical Sci.* 1380; 12 (3): 11 - 14. [Persian].

16. Farokhafal KH, Fatehi M, Hasanabad Z. Evaluation of cardiovascular effects of five native plants in south Khorasan. *Tabibe Shargh.* 1384; 7 (1): 31 - 38 [Persian].

17. Asgari S, Naderi GH, Sadeghi M, Sabet B, Mohamadifard N. Antihypertensive and antihyperlipidemiic effect of Achillia wilhelmsii. *Drug Exp Clin Res.* 2000; 4: 89 - 93.

18. Sokmen A, Sokmen M, Daferea D, Polissiou M. The in vitro antioxidant and antimicrobial activitise of the essential oil and extracts of Achillia biebersteni Afan. *Phytother. Res.* 2004; 18 (6): 451 - 6.

19. Anderson FJ. An illustrated history of the herbals. Columbia university press. Chemesova, I., Belenovskaya, L. K. and Stukov, A. N. 1987, Rastiitle'nye Resursy: pp: 3 - 100.

20. Jean V, Plant health, Cure disease by plants. Translated by Ahmad Emami, MR ShamsArdekani, Nekoei -Naini N, Rahekamal publication. Tehran. 1381, pp: 358 - 61.

21. Abroise-Thomas P. Current data on major novel antimalaria drugs: Artemisinin derivatives, *Bulletin of the National Academy of Medicine (France)* 1999; 183 (4): 797 - 800.

22. Kager PA, de Vries PJ. Why is malaria in Vietnam under control, but Africa is threatened with a malaria disaster. *Netherlands Journal of Medicine* 2000; 144 (8): 357 - 361.

23. Morales MR, Denys J, James C, Simon E. Seasonal Accumulation of Artemisinin in Artemisia Annu L. ISHS Acta Horticulturae 344: International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 2005.

24. Ramezani M, Fazli-Bazzaz BS, Saghafi-Khadem F, Dabaghian A. Antimicrobial activity of four Artemisia species of Iran, *Fitoterapia* 2004 Mar; 75 (2): 201 - 3.

25. Savoia D. In vitro activity of different substances on the growth of Leishmania major. XIX Annual Meeting. Rome, Italy: Italian Section Society of Protozoologists, 1998.

26. Atalay S, Gülhan V-Ü, Moschos P, Dimitra D, Münevver S, Erol D. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of Achillea sintenisii Hub. Mor. (Asteraceae). Article first published online: 27 OCT 2003 DOI: 10.1002/ptr.1274.

27. Klinghardt DK. Lyme disease: a look beyond antibiotics. *Explor. Infect. Dis.* 2005; 14: 6 - 11.

28. Doroudgar A, Arbabi M, Razavi MR, Mohebbali M, Sadr FAD, Tashacor Z, Effect of Artemisia sieberi extract on leishmania major ulcers in Balb/c mice. *Feyz Fall* 2007; 11 (3 (Serial 43): 52 - 6.

29. Asmar M., Farahmand Beygi M, Aghighi Z, Ghaemi N, Ayatelahi A, In vitro and in vivo evaluation of therapeutic effects of vinca major alkaloidson *Leishmania major*. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Res.* Summer 2002; 1 (2): 1 - 8.

30. Talari S A, Doroudgar A, Ouzougi J, In vitro effect of various concentrations of Hedera Helix extract and Glucantime on visceral Leishmaniosis. *KAUMS Journal FEYZ* 1997; 1 (2): 61 - 7.

