

بررسی تاثیر ضد لیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه بر روی پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور

محمد براتی^۱، *دکتر ایرج شریفی^۲، دکتر فریبا شریفی^۳

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۵/۲۴

تاریخ اعلام وصول: ۸۹/۲/۱۴

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیوزها مجموعه‌ای از بیماری‌های انگلی را شامل می‌شوند که به صورت طیف وسیعی از علایم بالینی شامل لیشمانیوز پوستی، پوستی - مخاطی و احشایی، ظاهر می‌شود. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از گیاهان منبع غنی عوامل دارویی جدید را فراهم می‌کنند و در کشورهای آندمیک از گیاهان بومی جهت درمان بسیاری از عوامل عفونی استفاده می‌شود. اخیراً پیشرفتهای زیادی در زمینه استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان لیشمانیوز حاصل شده است. هدف از این تحقیق، تعیین اثر ضد لیشمانیایی سه فراورده گیاهی در مقایسه با داروی کنترل (تارتارامتیک) بر روی سویه استاندارد لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) سویه استاندارد به محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) و آنتی بیوتیک منتقل و در دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ کشت داده شد. سپس در مرحله ثابت رشد تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی در مقایسه با ترکیب سه ظرفیتی آنتی موان (تارتارامتیک) بر روی پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور با استفاده از روش رنگ سنجی MTT، مورد بررسی قرار گرفت. سپس میزان جذب نوری (Optical density) رنگ حاصله از احیا نمک تترازولیموم (MTT) به محصول رنگی فورمازان توسط انگل، بوسیله دستگاه الیزا ریدر (ELISA reader) سنجیده شد و مقدار IC_{50} که ۵۰٪ غلظت مهار کننده است، محاسبه گردید. برای این منظور آزمایشات به صورت دوپلیکیت انجام شد. این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از جذب نوری و IC_{50} نشان داد که عصاره قوزه پنبه در مقایسه با داروی کنترل و عصاره‌های دیگر دارای تاثیر بیشتری می‌باشد، به طوری که میزان IC_{50} داروی تارتارامتیک (کنترل) برابر با $4/7 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. همچنین میزان IC_{50} عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه به ترتیب $5/7 \mu\text{g/ml}$ ، $9/5$ و $3/6$ ، محاسبه شد. اگرچه عصاره قوزه پنبه نسبت به دو عصاره دیگر تاثیر بیشتری نشان داد، اما همه این عصاره‌ها بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور تاثیر قابل ملاحظه‌ای، نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه عصاره‌های گیاهی درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه بر روی پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی نشان داده‌اند، ضرورت انجام آزمایشات بیشتری جهت ارزیابی این عصاره‌ها بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، درمنه کوهی، آنقوزه، قوزه پنبه، عصاره‌های گیاهی، روش MTT

مقدمه

جنس لیشمانیا می‌باشد (۱، ۲). این بیماری در سراسر جهان منجمله

ایران انتشار دارد (۳)، به طوری که بروز این بیماری در افراد نظامی

لیشمانیوز یک بیماری گرمسیری ناشی از انگل داخل سلولی از

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشجوی دکتری تخصصی انگل‌شناسی
۲- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشجوی دکتری تخصصی (PhD) انگل‌شناسی (*نویسنده مسوول)
تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۴۶۱۶ آدرس الکترونیک: Dr.sharifi@armyums.ac.ir
۳- استادیار، ایران، کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی

مواد و روش‌ها

تهیه و استخراج عصاره‌های گیاهی

درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss) که از گیاهان بومی کرمان است و از منطقه کوهپایه کرمان جمع‌آوری و نمونه هرباریومی آن جهت شناسایی، تهیه گردید. سپس این گیاه جمع‌آوری، در سایه خشک و اندام‌های هوایی (ساقه، برگ و گل) آن جدا گردید و بعد از آسیاب کردن با روش پرکولاسیون با متانول ۸۰٪، عصاره گیری شد. صمغ گیاه آنقوزه (*Ferula assa-foetida*) از مراکز تجاری تهیه و با تست شناسایی صمغ مورد تأیید قرار گرفت، و با روش پرکولاسیون با متانول ۸۰٪ عصاره گیری شد.

گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum*) از اطراف شهرستان سبزوار جمع‌آوری و بعد از تهیه نمونه هرباریومی، شناسایی شد. قسمت قوزه آن در شرایط سایه خشک و پنبه‌های آن جدا و جهت عصاره گیری، آسیاب گردید. سپس با روش سوکسیله به مدت ۶-۴ ساعت با حلال کلروفرم عصاره گیری شد. علت استفاده از کلروفرم به دلیل وجود ترکیبات غیرقطبی قوزه پنبه و نحوه کاربرد آن در طب محلی می‌باشد.

در پایان، تمام عصاره‌های بدست آمده با روش تقطیر در خلأ تا حد خشک شدن تغلیظ و تا زمان انجام آزمایشات در یخچال نگهداری گردید.



شکل ۱- گیاه درمنه کوهی

و غیر نظامی و همچنین در افرادی که به مناطق آندمیک مسافرت می‌نمایند بیشتر است (۴). موارد لیشمانیوز پوستی طی سالهای اخیر همواره به دلیل مهاجرت تدریجی به شهرها، جابه جایی جمعیت، مواجهه افراد غیر ایمن، تخریب شرایط محیطی و اکولوژیکی، سوء تغذیه و همراهی با HIV رو به افزایش می‌باشد (۵).

درمان دارویی لیشمانیوز عمدتاً با استفاده از ترکیبات آنتی موان که در طی ۶۵ سال گذشته، صورت گرفته است (۶). داروهای خط اول جهت درمان این بیماری‌ها ترکیبات آنتی موآن پنج ظرفیتی می‌باشند (۷، ۸، ۹). در عین حال اغلب این داروها سمی بوده و دارای اثرات جانبی زیادی هستند (۲، ۱۰، ۱۱). از طرفی درمان لیشمانیوز در کشورهای آندمیک بسیار هزینه بر است و استفاده نادرست از این ترکیبات باعث افزایش موارد مقاومت دارویی و بروز موارد عفونت همزمان با HIV، شده است (۶). علاوه بر این، درمان دارویی می‌تواند با ایجاد تغییر در حساسیت گونه‌های لیشمانیا نسبت به دارو، اختلاف در فارماکوکینتیک و همچنین در تداخل ایمنی میزبان-دارو را پیچیده کند (۱۲).

اغلب داروهایی که برای درمان لیشمانیوز استفاده می‌شوند، دارای یک یا چند محدودیت می‌باشند، از جمله اینکه مقرون به صرفه نیستند، از نظر نحوه مصرف و همچنین سمیت دارای مشکلاتی می‌باشند و مهمترین مسئله در مورد این داروها گسترش مقاومت انگل به این داروها می‌باشد. در حال حاضر افزایش مقاومت در برابر ترکیبات آنتی موان به عنوان یک هشدار و چالش عمده در موفقیت درمانی، مطرح است (۱، ۸). از این رو نیاز به گسترش ترکیبات ضد لیشمانیایی موثر، کم هزینه، با سمیت کم و همچنین با قابلیت تجویز از راه خوراکی، نسبت به گذشته، بیشتر احساس می‌شود (۱).

از آنجا که داروهای گیاهی دارای عوارض جانبی کمتری هستند و همچنین قابل دسترس و کم هزینه می‌باشند، در نتیجه استفاده از گیاهان بومی هر منطقه که می‌تواند به عنوان منبع غنی عوامل دارویی ضد لیشمانیایی محسوب شوند، ضروری به نظر می‌رسد (۱۳).

این تحقیق با هدف تعیین اثر ضد لیشمانیایی سه فراورده گیاهی استخراج شده، بر روی پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی در طی سالهای ۱۳۸۷-۱۳۸۵ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شده است.

کشت $100 \mu\text{g/ml}$ استرپتوما یسین (Gibco-BRL)، در دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ، کشت داده شد. سپس پروماستیگوت‌هایی که در محیط کشت به فاز ثابت رشد (Stationary-phase) رسیدند با استفاده از لام هموسیستمتر در زیر میکروسکوب شمارش و به تعداد $5 \times 10^5/\text{ml}$ سلول تعدیل گردید.

روش MTT

یک روش کمی اسپکتروفتومتری است که جهت تعیین زنده بودن سلول‌ها به کار می‌رود که اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط Mosmann معرفی شد (۱۶، ۱۷). این روش، یک روش رنگ سنجی است که طی آن نمک تترازولیوم (۲-yl-۴،۵-dimethylthiazol-۳-Tetrazolium salt) (MTT [۲،۵-diphenyl Tetrazolium bromide] - به یک محصول رنگی فورمازان نامحلول تبدیل می‌شود (۱۰، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۵). (این واکنش احیاء، توسط فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل صورت می‌گیرد (۱۰، ۱۸، ۲۵)) که به عنوان یک مولفه رشد و زنده بودن پروماستیگوت‌ها در برابر پاسخ دارویی به کار می‌رود (۱۸). برای تهیه محلول MTT، ۵ میلی گرم از پودر MTT را در ۱ میلی لیتر محلول PBS استریل (۵mg/ml) حل می‌کنیم.

اضافه کردن پروماستیگوت‌ها، دارو و عصاره‌ها به پلیت از پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور موجود در محیط کشت که در فاز ثابت رشد (Stationary phase) هستند به میزان $100 \mu\text{l}$ برداشته و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت دوپلیکیت (Duplicate) اضافه می‌کنیم به نحوی که در هر چاهک 5×10^5 پروماستیگوت قرار می‌گیرد.

در ادامه از عصاره‌های مختلف و داروی کنترل که به ترتیب در غلظت‌های $31/25$ ، $62/5$ ، 125 ، 250 ، 500 و 5000 میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد و به میزان $100 \mu\text{l}$ به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت دوپلیکیت، اضافه گردید. علاوه بر این از شاهد (بلانک) نیز استفاده شد، بدینصورت که در یک چاهک پلیت فقط $100 \mu\text{l}$ محیط کشت فاقد پروماستیگوت و یا دارو اضافه گردید. همچنین به دو چاهک دیگر فقط پروماستیگوت‌های انگل به عنوان کنترل اضافه شد و بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، پلیت‌ها را خارج کرده و به میزان 10% حجم هر چاهک از محلول ذخیره MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) که قبلاً تهیه شده بود به داخل هر چاهک ریخته شد.



شکل ۲- گیاه انقوزه



شکل ۳- گیاه پنجه

تهیه کنترل

از داروی تارتارامتیک (Potassium antimony ۳- oxide tartrate hemihydrate) به عنوان کنترل استفاده گردید. این دارو یک آنتی موان سه ظرفیتی است که به صورت پودر از شرکت Merck آلمان تهیه گردید.

تهیه و کشت انگل

در این تحقیق از پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور سویه MRHO/IR/۷۵/ER تهیه شده از مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران، استفاده شد. ابتدا پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور در محیط کشت (Gibco-BRL) RPMI-۱۶۴۰ حاوی 10% سرم جنین گوساله و 100 IU/ml پنی سیلین و

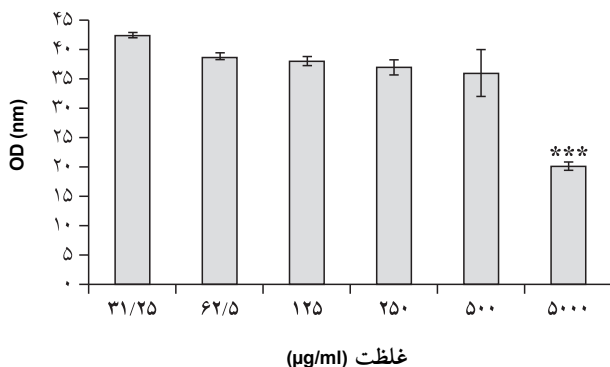
مربوط به اختلاف در غلظت $5000 \mu\text{g/ml}$ با سایر غلظت‌ها می‌باشد که نشان‌دهنده آن است که این دارو رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را مهار می‌کند (نمودار ۱). با توجه به اینکه اثر غلظت $5000 \mu\text{g/ml}$ داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌ها نسبت به غلظت‌های دیگر دارای تاثیر بهتری بود، جهت تعیین اثر ضد لیشمانیایی، همین غلظت با غلظت‌های عصاره‌های مختلف گیاهان، مقایسه گردید. سپس غلظت‌های مختلف هر کدام از عصاره‌ها به صورت جداگانه با غلظت $5000 \mu\text{g/ml}$ داروی کنترل، مورد ارزیابی قرار گرفت.

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره درمنه بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

به طور کلی میانگین جذب نوری در گروه‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری ($P < 0/001$) نشان داد که در غلظت‌های $25/31 \mu\text{g/ml}$ ، $62/5$ ، 125 ، 250 و 500 به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) میانگین جذب نوری بالاتر بود و در آزمون Post Hoc اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های فوق و گروه کنترل دیده شد (نمودار ۲).

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آنقوزه بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

میانگین جذب نوری بین عصاره آنقوزه و داروی کنترل اختلاف معنی‌داری ($P < 0/001$) نشان داد که این عصاره در غلظت $31/25 \mu\text{g/ml}$ به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) دارای میانگین جذب نوری بالاتر و در بقیه غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۳).



*** تفاوت معنی‌داری بین غلظت $5000 \mu\text{g/ml}$ با سایر غلظت‌ها مشاهده شد ($P < 0/001$).
OD: جذب نوری

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

چاهک کنترل منفی حاوی $100 \mu\text{M}$ محیط کشت و فقط حاوی $10 \mu\text{M}$ از محلول MTT می‌باشد. متعاقباً پلیتها به مدت ۳-۴ ساعت در دمای $37 \pm 2^\circ\text{C}$ انکوبه شد. بعد از مدت زمان انکوباسیون، پلیتها را از انکوباسیون بیرون آورده و کریستال‌های فورمازان را با افزودن حجمی معادل محیط کشت اولیه یعنی معادل $100 \mu\text{M}$ به هر چاهک از محلول ایزوپروپانل اسیدی (اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در ایزوپروپانل خالص) جهت حل کردن رنگ افزوده شد. رنگ حاصله در طول موج 492 nm با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (ELISA reader) قرائت گردید و جذب نوری (Optical density, OD) بدست آمد. سپس میزان IC_{50} (Inhibitory concentrations ۵۰٪) یعنی غلظتی از عصاره که از رشد ۵۰٪ ارگانیسیم جلوگیری می‌کند، محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

در مطالعه حاضر جهت مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه‌ها از آزمون آماری ANOVA استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن آن آزمون Post Hoc-dunnnett جهت تعیین اثر بخشی داروی کنترل و عصاره‌ها، مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، سطح معنی‌دار $P < 0/05$ و فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪ در نظر گرفته شد. برای این منظور نرم افزار SPSS version ۱۷ جهت آنالیز داده‌ها، مورد استفاده قرار گرفت.

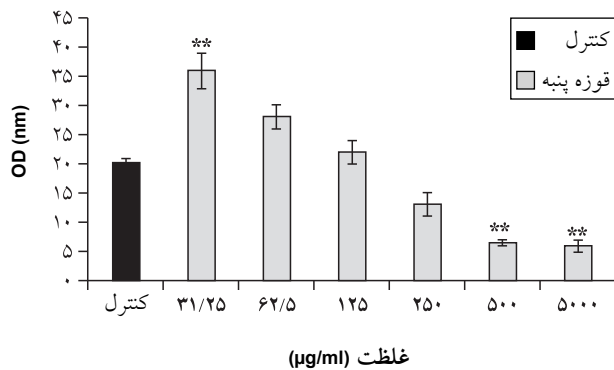
همچنین با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (ELISA reader) و جذب نوری (OD) بدست آمده بر اساس فرمول زیر میزان IC_{50} با نرم افزار EXCEL محاسبه گردید:

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

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.

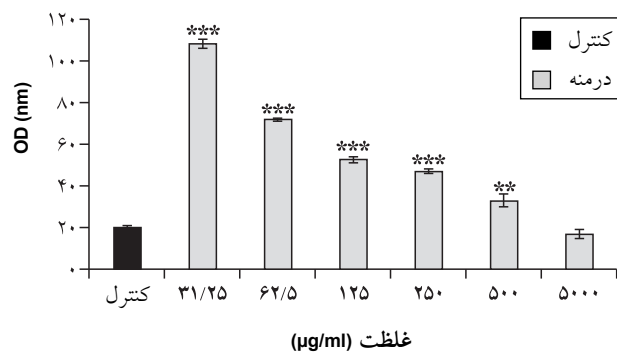
یافته‌ها

در این بررسی ابتدا غلظت‌های مختلف داروی کنترل (تارتارامتیک) تهیه و اثر ضد لیشمانیایی آن تعیین شد که از نظر آماری بین تاثیر غلظت‌های مختلف ($31/25 - 5000 \mu\text{g/ml}$) اختلاف معنی‌داری ($P < 0/001$) مشاهده شد و این اختلاف در آزمون Post Hoc



*** (P < ۰/۰۰۱) و ** (P < ۰/۰۱) کنترل: داروی تارتارامیتیک OD جذب نوری

نمودار ۴- مقایسه میانگین جذب نوری عصاره قوزه پنبه و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور



*** (P < ۰/۰۰۱) و ** (P < ۰/۰۱) کنترل: داروی تارتارامیتیک OD جذب نوری

نمودار ۲- مقایسه میانگین جذب نوری عصاره درمنه کوهی و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

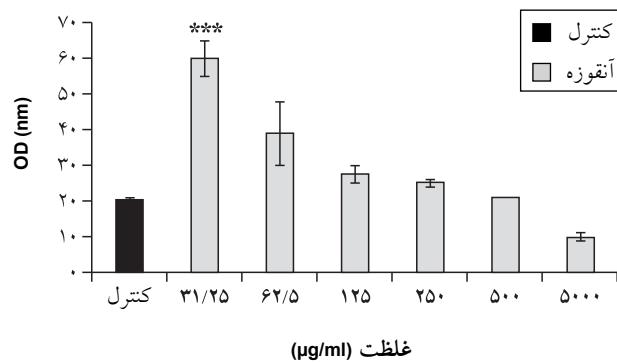
بحث و نتیجه گیری

لیثمانیوز مجموعه‌ای از بیماری‌های انگلی است که به صورت طیف وسیعی از علائم بالینی نظیر لیثمانیوز پوستی، پوستی- مخاطی و احشایی ظاهر می‌شود. اپیدمیولوژی و نشانه‌های بیماری به دلیل وجود فاکتورهای متعدد انگل، ناقل، میزبان و محیط بسیار متغیر است (۴، ۱۴).

جهت بررسی رشد و زنده بودن پروماستیگوت‌های لیثمانیا روش‌های مختلفی شامل شمارش مستقیم سلول‌های زنده با استفاده از لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ، اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و روش‌های رنگ سنجی (Colorimetry) بر اساس واکنش احیای نمک تترازولیموم، معرفی شده است (۱۵).

روش‌های رنگ سنجی در مقایسه با روش شمارش مستقیم که یک روش غیر دقیق، وقت گیر، دشوار و غیر قابل اعتماد است، دارای مزایای زیادی است از جمله اینکه روش رنگ سنجی، روش آسان، کم هزینه، حساس، قابل اعتماد و تکرار پذیر است و بدلیل عدم استفاده از مواد رادیوایزوتوپ، ایمن و مطمئن می‌باشد (۱۰، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹).

بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که پتاسیم آنتی موان تارتارات (تارتارامیتیک) که فرم سه ظرفیتی آنتی موان است در مقایسه با اشکال پنج ظرفیتی ترکیبات آنتی موان از جمله، مگلو مین آنتی مونات (Meglumine antimoniate) یا گلوکانتیم و همچنین سدیم استیبوگلوکونات (Sodium stibogluconate) یا پنتوستام در محیط کشت دارای تاثیر بهتری می‌باشد (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳) علاوه بر این تارتارامیتیک نسبت به مگلو مین آنتی مونات علیه پروماستیگوت و



*** (P < ۰/۰۰۱) کنترل: داروی تارتارامیتیک OD جذب نوری

نمودار ۳- مقایسه میانگین جذب نوری عصاره آنقوزه و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره قوزه پنبه بر پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

مقایسه میانگین جذب نوری عصاره قوزه پنبه و داروی کنترل نشان داد که بین این گروه‌ها اختلاف معنی داری (P < ۰/۰۰۱) مشاهده شد و در غلظت‌های ۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به طور معنی داری (P < ۰/۰۱) میانگین جذب نوری کمتری داشت (نمودار ۴).

در روش MTT با تاثیر عصاره‌ها و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت انگل لیثمانیا ماژور، IC₅₀ بین ۳/۶-۷/۵ µg/ml بدست آمد، به طوری که IC₅₀ برای داروی کنترل ۴/۷ µg/ml محاسبه شد که نشان‌دهنده تاثیر تارتارامیتیک در غلظت ۴/۷ µg/ml است. همچنین IC₅₀ در مورد هر کدام از عصاره‌ها به صورت جداگانه محاسبه شد، به طوری که در عصاره درمنه برابر با ۷/۵ µg/ml و همچنین عصاره آنقوزه برابر با ۵/۹ µg/ml و در عصاره قوزه پنبه ۳/۶ µg/ml محاسبه شد.

نشان داد، به عنوان ملاک قیاس انتخاب گردید، لذا مقایسه این رقت کدام با هر کدام از غلظت‌های عصاره‌های گیاهی در این تحقیق بسیار سخت گیرانه بود. به عبارت دیگر انتخاب رقت‌های پایین‌تر داروی کنترل و مقایسه آن با هر کدام از غلظت‌های عصاره‌ها این تاثیر را به صورت مضاعف نشان خواهد داد و جذب نوری هر کدام از غلظت‌های عصاره‌ها مشابه با کنترل، به معنی تاثیر مطلوب آن عصاره، تلقی می‌شود.

نتایج این بررسی نشان داد که عصاره درمنه که در این مطالعه دارای کمترین تاثیر می‌باشد و در غلظت‌های $۳۱/۲۵ \mu\text{g/ml}$ ، $۶۲/۵$ ، ۱۲۵ ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ بی تاثیر می‌باشد و تنها در غلظت $۵۰۰۰ \mu\text{g/ml}$ با داروی کنترل هم خوانی دارد. از طرفی عصاره قوزه پنبه که بهترین اثر را از خود نشان داد فقط در غلظت $۳۱/۲۵ \mu\text{g/ml}$ بی تاثیر بود و در غلظت‌های دیگر با داروی کنترل هم خوانی داشت، به طوریکه در غلظت ۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به داروی کنترل، موثرتر بود.

همچنین مقایسه IC_{50} بین عصاره‌ها و داروی کنترل نشان می‌دهد که عصاره قوزه پنبه نسبت به داروی کنترل دارای IC_{50} کمتری است و در نتیجه در مقایسه با داروی کنترل تاثیر بهتری دارد، در صورتی که سایر عصاره‌ها که IC_{50} بیشتری نسبت به داروی کنترل نشان دادند، در نتیجه تاثیر کمتری دارند.

با توجه به اینکه عصاره‌های گیاهی درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه بر روی پروماستسگوتهای لیشمانیا ماژور اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی نشان داده‌اند، ضرورت انجام آزمایشات بیشتری جهت ارزیابی این عصاره‌ها بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به لحاظ تامین اعتبار طرح و آقای دکتر نوذر نخعی به دلیل مشاوره آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها و همچنین آقای دکتر علی اکبر حق دوست به لحاظ محاسبات IC_{50} تشکر و قدردانی می‌شود.

آماستسگوت موثرتر بوده که بیانگر تبدیل فرم پنج ظرفیتی به فرم سه ظرفیتی می‌باشد (۲۲، ۲۳، ۲۴). در نتیجه فرم سه ظرفیتی آنتی موان (III) sb بر اشکال داخل و خارج سلولی انگل لیشمانیا ماژور، موثر می‌باشد.

بنابراین در این تحقیق جهت مقایسه فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره‌های مختلف گیاهی بر روی پروماستسگوتهای لیشمانیا ماژور از داروی تارتارامتیک به عنوان کنترل استفاده شد. انتخاب تارتارامتیک به عنوان کنترل در این تحقیقات به دو علت مورد توجه قرار گرفته است، اول اینکه داروی تارتارامتیک به صورت پودر تحت GMP (Good Manufacturing Product) از کارخانه سازنده (Merck Germany) در دسترس قرار گرفت و دیگر اینکه، تمام ترکیبات آنتی موان پنج ظرفیتی به شکل پیش دارویی هستند و نیاز به احیا بیولوژیکی دارند تا به شکل سه ظرفیتی درآیند تا بدین وسیله فعالیت ضد لیشمانیایی خود را اعمال نمایند (۲۲، ۲۳).

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها و داروی تارتارامتیک، اثر مهاري بر روی پروماستسگوتهای لیشمانیا ماژور افزایش می‌یابد و کاهش جذب نوری (OD) نشان‌دهنده این اثر مهاري می‌باشد. دلیل افزایش جذب نوری نیز مربوط به رنگ فورمازانی است که بوسیله فعالیت متابولیکی آنزیم میتوکندریایی دهیدروژناز در سلول‌های فعال و زنده تولید می‌شود که با تعداد سلول‌های زنده در ارتباط است. در مطالعه حاضر مقایسه میانگین جذب نوری عصاره‌های مورد بررسی و داروی کنترل، دارای اختلاف معنی داری بود که این نشان می‌دهد همه عصاره‌ها به نسبت‌های مختلفی باعث کاهش رشد انگل لیشمانیا ماژور شدند.

علاوه بر این با مقایسه میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و کنترل میزان تاثیر هر کدام نشان داده شده است، به طوری که اگر عصاره مورد نظر در غلظت خاصی دارای میانگین جذب نوری بالاتر باشد، نشان‌دهنده تاثیر کمتر آن است و در صورتیکه میانگین جذب نوری آن کمتر باشد بیانگر تاثیر بهتر عصاره می‌باشد. علاوه بر این همانطور که اشاره شد، غلظت $۵۰۰۰ \mu\text{g/ml}$ داروی کنترل که بهترین پایش را در مهار رشد انگل لیشمانیا ماژور از خود

References

- 1- Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*. 2008 Oct 31.
- 2- Saleheen D, Ali SA, Yasinzai MM. Antileishmanial activity of aqueous onion extract in vitro. *Fitoterapia*. 2004 Jan;75(1):9-13.
- 3- 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 Nov 1;114(2):254-9.
- 4- Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2007 Mar-Apr;25(2):203-11.
- 5- W.H.O. Control of the leishmania (Report by the Secretariat). W.H.O: EB118/4. 2006.p.1-7.
- 6- Natera S, Machuca C, Padron-Nieves M, Romero A, Diaz E, Ponte-Sucre A. Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Jun;29(6):637-42.
- 7- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):399-410.
- 8- Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*. 2005 Sep;66(17):2056-71.
- 9- Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis*. 2007 May;5(3):150-8.
- 10- 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 Jun;54(2):119-22.
- 11- Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 2005 Jun;12(6-7):514-35.
- 12- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jan;19(1):111-26.
- 13- 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 Nov 14;102(2):185-90.
- 14- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;27(5):305-18.
- 15- Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int*. 2000 Jan;48(3):265-9.
- 16- 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.
- 17- 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 May 22;89(2):271-7.
- 18- Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. *Res Microbiol*. 2004 May;155(4):224-30.
- 19- Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *J Microbiol Methods*. 2006 Jul;66(1):79-86.
- 20- Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Jun;27(6):916-20.
- 21- Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1234-9.
- 22- Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Sep;37(9):1842-6.
- 23- Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 May;41(5):972-6.
- 24- Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouassiss A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of Leishmania infantum used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Dec;42(12):3097-102.
- 25- 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 Dec;55(3):813-6.

Antileishmanial activity of *Artemisia aucheri*, *Ferula asa-foetid* and *Gossypium hirsutum* extracts on *Leishmania major* promastigotes in vitro

Barati. M; PhD Student¹, *Sharifi. I; PhD², Shariffar. F; PhD³

Received: 4 May 2010

Accepted: 15 Aug 2010

Abstract

Background: Leishmaniasis is a complex disease with a broad spectrum of clinical features, usually divided into cutaneous leishmaniasis (CL), muco-cutaneous leishmaniasis (MCL), and visceral leishmaniasis (VL). Plant extracts or plant-derived compounds are likely to provide a valuable source of new medicinal agents. In endemic countries, a number of traditional plants are commonly used to treat infectious conditions. Advances in the research of natural products for the treatment of leishmaniasis have been recently reviewed. To evaluate, anti-Leishmanial activity of three plant extracts on *Leishmania major* promastigotes as compared to a trivalent antimonial compound (tartar emetic), in vitro.

Materials and methods: promastigote stages of *L. major* (MRHO/IR/75/ER) were transferred to RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics then grown at 25±2°C. The biological activity of plant extracts in comparison to potassium antimonyl tartrate [Sb(III)] on *L. major* promastigotes were assessed by using a MTT assay. 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 by ELISA reader. The IC₅₀ values (50% inhibitory concentrations) were determined, accordingly. 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 hour of incubation and drug control had a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 4.7 µg/ml, and IC₅₀ values of plant extracts *Artemisia aucheri*, *Ferula asa-foetida* and *Gossypium hirsutum* were 7.5, 5.9 and 3.6 µg/ml, respectively. Although *Gossypium hirsutum* was more effective than others, but all extracts had profound effect on promastigotes of *L. major*.

Conclusion: Plant extracts including *Artemisia aucheri*, *Ferula asa-foetida* and *Gossypium hirsutum* have anti-leishmanial effects in vitro. Further works are required to evaluate the exact effect of these extracts on *Leishmania* species in animal models.

Keywords: *Leishmania major*, *Artemisia aucheri*, *Ferula asa-foetida*, *Gossypium hirsutum*, Plant extracts, MTT assay

1- Researcher, Aja University of Medical Sciences, PhD Student, Tehran, Iran.

2- (*Corresponding Author) Professor, Kerman University of Medical Sciences, Dept. of Parasitology and Leishmania Research Center, Kerman, Iran. Tel: 0341-3224616 E-mail: iraj.sharifi@yahoo.com

3- Assistant Professor, Kerman University of Medical Sciences, Pharmacy Faculty, Dept. of Pharmacology, Kerman, Iran.