

بررسی اثر عصاره هیدرولالکلی چای کوهی و برگ ازگیل بر روی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

مرضیه اسدی^۱ سمیه بهرامی^۲ رؤیا انصاری سامانی^۳ نسیم پاک نیت^{*}

^۱ کارشناس ارشد انگلشناسی، ^۲ کارشناس ارشد بافت‌شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ^۳ دانشجوی دوره دکترای تخصصی انگلشناسی دامپزشکی، ^۴ دکترای دامپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
مجله پزشکی هرمزگان سال پانزدهم شماره چهارم زمستان ۹۰ صفحات ۲۷۹-۲۸۴

چکیده

مقدمه: لیشمانیا ماژور عامل ایجاد لیشمانیوز جلدی می‌باشد و داروهایی که برای درمان لیشمانیوز استفاده می‌شوند، عوارض جانبی نامطلوبی دارند. گیاه چای کوهی و برگ ازگیل خواص دارویی مناسبی دارند ولی گزارشی درباره خاصیت ضد لیشمانیایی آنها ارائه نشده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر ضد لیشمانیایی عصاره هیدرولالکلی چای کوهی و برگ ازگیل است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، برگ ازگیل و چای کوهی به مقدار لازم جمع‌آوری شده و عصاره هیدرولالکلی آنها تهیه شد. پروماستیگوت‌های لیشمانیایی ماژور در محیط کشت NNN کشت داده شدند. تأثیر عصاره‌های منکر بر بقای پروماستیگوت‌ها در غلظت‌های $100\text{, }500\text{, }250\text{, }50\text{, }10$ میکروگرم در میلی لیتر توسط آزمون آنالیز واریانس ارزیابی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت‌های عصاره چای کوهی و برگ ازگیل تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد. اختلاف میانگین تعداد پروماستیگوت بین گروه‌های مختلف نشان داد که در چای کوهی اختلاف میانگین تعداد پروماستیگوت در گروه تیمار شده با غلظت 500 میکروگرم در مقایسه با غلظت 1000 میکروگرم معنی دار بود ($P < 0.05$). همچنین اختلاف میانگین تعداد پروماستیگوت در گروه 1000 میکروگرم در مقایسه با گروه 1000 میکروگرم در برگ ازگیل نیز معنی دار بود ($P < 0.05$). بررسی آماری اثرات دارویی چای کوهی و برگ ازگیل در غلظت 1000 میکروگرم نشان می‌هد که اثر بخشی این دو عصاره اختلاف چندانی با هم نداشته و اثرات تقریباً یکسانی روی میانگین تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیایی دارند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصله، چای کوهی و برگ ازگیل می‌توانند گیاهان مناسبی برای بررسی خاصیت ضد لیشمانیایی در شرایط آزمایشگاهی باشند.

کلیدواژه‌ها: چای کوهی - برگ ازگیل - لیشمانیایی ماژور - شرایط آزمایشگاهی

نویسنده مسئول:

مرضیه اسدی

گروه انگلشناسی - دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

شهرکرد - ایران

تلفن: +۹۸ ۲۸۱ ۳۳۴۵۰۸

پست الکترونیکی:

marziasadi234@gmail.com

دریافت مقاله: ۸۹/۶/۳۱ اصلاح نهایی: ۸۹/۸/۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۱۴

۲۰/۰۰۰ مورد جدید از بیماری از نقاط مختلف ایران گزارش

مقدمه:

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماریهای انگلی شایعی است که در حال حاضر در ۸۸ کشور جهان به شکل بومی وجود دارد (۱-۴). در ایران میزان بروز لیشمانیوز جلدی به طور متوسط حدود ۲۸ در هر هزار نفر جمعیت است و سالیانه حدود

می‌شود.^(۱) در حال حاضر برای درمان لیشمانیوز جلدی از ترکیبات مختلف پنج ظرفیتی آنتی‌موآن نظریر گلوكانتئیم استفاده می‌شود. این دارو به دلیل ویژگی‌های سمیتی ذاتی و تکرار عمل تزریق و دوز بالا منجر به بروز عوارض جانبی همچون اختلالات کبدی،

در این پژوهش استفاده از عصاره هیدروالکی چای کوهی و برگ ازگل بر روی محیط کشت لیشمانیوز مورد مطالعه قرار گرفته است تا در صورت مؤثر بودن، اثر آنها در درمان رخمهای لیشمانیوز پیشنهاد شود چرا که تاکنون بررسی علمی روی اثرگذاری عصاره این دو گیاه روی لیشمانیا مأمور انجام نگرفته است.

روش کار:

تهیه عصاره: در این مطالعه اندام هوایی گیاه چای کوهی از اطراف شهر هفشجان از توابع استان چهار محال و بختیاری و برگ درخت ازگل از استان مازندران جمع‌آوری گردید. بعد از گذراندن مراحل خشک شدن در سایه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به روش خیساندن در حرارت ۱۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد به کم اتانول ۷۵٪ عصاره‌گیری انجام شد. برای این منظور ۵۰۰ سی سی اتانول ۷۵٪ بر روی ۱۰۰ گرم پودر گیاه ریخته شد تا حدی که سطح پودر را کاملاً پوشاند. در این فاصله مخلوط مورد نظر هر چند ساعت یکبار و هر بار به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه، روی شیکر قرار داده شده تا مواد مؤثره گیاه بهتر خارج شود. پس از گذشت ۴۸ ساعت با استفاده از قاعده صافی واتمن محلول دو بار صاف گردید. محلول حاصل در دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) به میزان یک سوم مقدار اولیه تغییل شده و برای خشک شدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سویه استاندارد لیشمانیا مأمور با ک MRHO/IR/75/ER از محیط استوک به درون محیط حد کفايت رشد کند. به عنوان فاز مایع از ۰/۲ میلی لیتر، BHI درصد و آنتی‌بیوتیکهای استریپومایسین به میزان ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر محیط و پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ واحد میلی لیتر محیط استفاده شد. مناسبترین مرحله انگل در محیط کشت برای نکهداری آن در شرایط زندگه و انجام، فاز لگاریتمی انگل می‌باشد؛ لذا غلاظتی از انگل به میزان 10^7 پروماستیگوت در هر میلی لیتر تهیه گردید. به منظور تکثیر و تطابق انگل پلیت‌های حاوی محیط کشت لیشمانیا N. N. N. اصلاح شده تهیه شد. پروماستیگوت‌های کشت شده پس از شمارش با محیط مایع RPMI 1640 رقیق شدند. با استفاده از

قلبی و تغییرات بیوشیمیایی می‌شود (۵). در حال حاضر در بسیاری از نقاط جهان تحقيقات زیادی در جهت ابداع و ارزیابی روشهای مختلف درمانی لیشمانیوز در حال انجام است. نمونه‌ای از روشهای درمانی بیماری، درمان سالک با استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد (۶-۷).

گیاه چای کوهی گیاهی از خانواده نعنائیان می‌باشد که در تحقيقات بسیاری اثرات ضد میکروبی گیاهان متعلق به خانواده نعنائیان از جمله جنس استکیس به اثبات رسیده است (۶). گونه‌های جنس استکیس از خانواده لامیاسه با تنوعی وسیع حدود ۳۰۰ گونه در سراسر جهان به خصوص نقاط مختلف ایران پراکنده بوده و به صورت بومی یافت می‌شود (۷). جنس استکیس دارای گونه‌هایی است که در طب سنتی برای درمان برخی از بیماریها از دیرباز مورد استفاده قرار می‌گرفته است. اثرات درمانی این گیاه به عنوان یک داروی ضدغفاری کننده ریوی و برخی از بیماریهای التهابی شناخته شده است (۸-۹). برخی مطالعات نشان داده‌اند که تیره نعنائیان دارای خواص ضد لیشمانیایی نیز می‌باشند. بررسی دی جورجیو و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که گونه‌های مختلف گیاه استکیس اثر ضد لیشمانیایی دارند که دلیل آن وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در این گیاه باشد (۹).

ازگل، درختچه‌ای است از تیره گل سرخیان که در جنگل‌های اروپای مرکزی و نواحی معتدل آسیا می‌روید. همچنین ازگل ازگل در تمام جنگل‌های شمال ایران و همه ارتفاعات سواحل دریا و در دامنه‌های البرز به طور خودرو عمل می‌آید و با نام محیط هر منطقه شناخته می‌شود (۱۰). خواص دارویی ازگل از روزگاران بسیار دور مورد توجه بوده؛ بقراط ازگل را برای مبتلایان به ترشی معده و مدفوع سوزان و عوارض تب نافع می‌پنداشت. خواص دارویی جوشانده برگ ازگل شامل درمان آبسه دهان و گلو، درمان آثرین، درمان برفک، درمان اسهال بچه‌ها، منظم‌کننده کار روده‌ها و ورم گلو و ناراحتی‌های حلق می‌باشد (۱۱-۱۲). طبق مطالب موجود در کتب طب اسلامی جوشانده برگ ازگل نیمه گرم یا خشک به صورت حمام یا محلول مالیدنی روی پوست باعث درمان سریع سالک می‌شود. این جوشانده علاوه بر معالجه سالک مقوی برای پوست‌های ضعیف است (۱۳).

نتایج:

نتایج بررسی چگونگی رشد لیشمانیا در زمانهای مختلف بر روی سه محیط کشت تلقیح شده لیشمانیا در جدول شماره ۱ و شکل ۱، همانطور که از داده‌های جدول شماره ۱ دیده می‌شود، زمان لازم برای کشت و شمارش تعداد پروماستیگوتها ۴۸ ساعت تعیین گردید. با توجه به اینکه سه محیط کشت شاهد برای رشد استاندارد انگل لیشمانیا مأذون در نظر گرفته شده بود.

جدول شماره ۱- شمارش تعداد پروماستیگوتها در محیط کشت

پس از کشتن زمانهای مختلف از تلقیح

	میانگین تعداد پروماستیگوت لکاریتم میانگین پروماستیگوت ($\times 10^5$)	زمان (ساعت)
۶	۱۰	۲۴
۷/۱۷	۱۵	۴۸
۷/۱۷	۱۵	۷۲

میانگین سه بار شمارش پس از ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف در جدول شماره ۲ آورده شده است.

سمپلر پروماستیگوتها رقیق شده به درون پلیتهای حاوی محیط کشت ریخته شده و به صورت اسمیر در سطح پلیت گسترش یافتد.

برای بررسی چگونگی رشد لیشمانیا در زمانهای مختلف بر روی سه محیط کشت تلقیح شده لیشمانیا، آزمایش صورت گرفت. به این ترتیب که محیط‌های کشت را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده و در بازه‌های زمانی ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت شمارش انجام گرفت و بهترین زمان برای رشد لیشمانیا انتخاب گردید.

۵ غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ (میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌ها در این آزمایش در نظر گرفته شده و آزمایش سه بار جداگانه تکرار شد. نمونه‌ها به روش شمارش مستقیم و با استفاده از لام‌نئوبار به مدت سه روز مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه، تست Tukey و آزمون t تجزیه و تحلیل شدند و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۲- میانگین سه بار شمارش پس از ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف عصاره چای کوهی و برگ ازگل

انحراف معیار \pm میانگین تعداد پروماستیگوت ($\times 10^5$) در محیط کشت ($\mu\text{g/ml}$)							عصاره گیاه
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۰۰	۵۰	نمونه شاهد		
۲۳/۵±۲/۵	۳۹±۲	۴۰±۴	۴۲±۲	۴۲/۵±۴/۵	۵۴±۳/۵	چای کوهی	
۱۷±۲	۳۷±۴	۴۱±۵	۴۴±۶	۴۶/۵±۴/۵	۵۴±۳/۵	برگ ازگل	

در برگ ازگل: اختلاف میانگین تعداد پروماستیگوت در غلظت ۵۰ میکروگرم و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در مقایسه با گروه ۱۰۰۰ میکروگرم نیز معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در بقیه موارد اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود.

استفاده از آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را بین میانگین تعداد پروماستیگوتها در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم گروه تحت درمان با عصاره هیدرولالکی چای کوهی و گروه تحت درمان با عصاره هیدرولالکی برگ ازگل نمی‌دهد.

نتایج حاصله شان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف عصاره چای کوهی و برگ ازگل، اختلاف معنی‌دار آماری از نظر تعداد پروماستیگوت در هر دو غلظت وجود دارد ($P < 0.05$).

اختلاف میانگین تعداد پروماستیگوت بین گروه‌های مختلف تجزیه و تحلیل شد و نتایج نشان داد که: در چای کوهی: اختلاف میانگین تعداد پروماستیگوت در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در مقایسه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در بقیه موارد اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود.

(۱۳۸۸) صورت گرفت، نشان داد که پس از ۳ هفته از پایان دوره درمان، عصاره هیدروالکی آویشن و بومادران در مقایسه با سالک تأثیر خوبی داشته‌اند (۱۵).

همانطور که در قسمت نتایج نیز اشاره شد، بررسی آماری اثرات دارویی چای کوهی و برگ ازگل در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم نشان می‌دهد که اثربخشی این دو عصاره اختلاف چندانی با هم نداشته و اثرات تقریباً یکسانی روی میانگین تعداد پروماستیگوتها لیشمانيا دارند.

در اجرای این پژوهش اگر از کشت سلولی ماکروفائز و یا ایجاد رخم روی دم موش با تزریق محلول انگلی آماده شده (غلظت‌های مشخصی از پروماستیگوتها لیشمانيا) به قاعده موش استفاده شود، نتایج مفیدتری بدست می‌آید. ولی به دلیل وجود محدودیت‌های موجود در این پژوهش، انجام چنین بررسی امکان‌پذیر نبوده است.

صرف ترکیب عالی خالص گیاهی به شکل پماد یا کرم به دلیل ایجاد مرگ و میر کمتر بدون داشتن اثر تحیریکی پوستی و سایر اثرات ناخواسته روش سالمتری در درمان رخم لیشمانياز پوستی در موشها می‌باشد. لذا استفاده از عصاره هیدروالکی چای کوهی و برگ ازگل به صورت پماد یا کرم برای رخمهای لیشمانياز پیشنهاد می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری:

با انجام این پژوهش مشخص گردید عصاره هیدروالکی چای کوهی و برگ ازگل بر روی پروماستیگوت لیشمانيا مازور در محیط کشت مؤثر بوده و موجب توقف رشد این عامل لیشمانياز می‌شوند و به نظر می‌رسد استفاده موضعی آنها بر روی پوست مبتلا به سالک مؤثر خواهد بود که البته باید بر روی موش آزمایشگاهی تست شود. همانطور که بررسی‌های آماری نیز نشان می‌دهند، افزایش غلظت عصاره‌های چای کوهی و برگ ازگل علاوه بر متوقف کردن رشد پروماستیگوتها لیشمانيا مازور، سبب کاهش مقدار آنها نیز می‌شوند. در واقع این دو عصاره اثر لیشمانياکشی مناسبی دارند. همچنین نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که اثر لیشمانياکشی این دو عصاره در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم نسبت به غلظت‌های کمتر، بالاتر بوده و ثابت می‌کند مهمترین عامل بر اثرگذاری این دو عصاره هیدروالکی بر لیشمانيا مازور، غلظت آنها می‌باشد. بررسی‌های انجام شده روی گونه‌های مختلف گیاه استکنس نشان می‌دهد که این گونه از گیاهان اثر ضد لیشمانيای دارند که دلیل آن وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در این گیاه باشد (۹). همچنین در طب اسلامی از جوشانده برگ ازگل برای درمان رخم سالک استفاده می‌شود.

تحقیقات و بررسی‌های زیادی روی اثربخشی انواع گیاهان دارویی بر لیشمانيا انجام شده است. در بررسی که توسط شریعتی فر و همکاران روی اثر ضد لیشمانيای میوه فلوس بر روی پروماستیگوت در محیط کشت (۱۳۸۴) شد نشان داد که در غلظت‌های ۰٪ تا ۹٪ هیچگونه رشد انگلی مشاهده نشد (۱۴). همچنین در مطالعه‌ای که توسط حجازی و همکاران در خصوص درمان لیشمانياز پوستی به روش گیاه درمانی با استفاده از عصاره هیدروالکی حنا، سیر، آویشن و بومادران

References**منابع**

1. Doroodgar A, Arbabi M, Razavi M, Mohebali M, Sadr F, Tashakkor Z. Effect of *Artemisia sieberi* extract on *Leishmania major* ulcers in BALB/c mice. *Feyz, Kashan University of Medical Sciences & Health Services.* 2007;3:52-56. [Persian]
2. Rando DG, Avery MA, Tekwani BL, Khan SI, Ferreira EI. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. *Bioorg Med Chem.* 2008;16:6724-6731.
3. Le Pape P. Development of new antileishmanial drugs - current knowledge and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2008;23:708-718.
4. Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, et al. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res.* 2008;103:1-10.
5. Hooshyar H, Talari S, Kazemi E. The effect of an alcoholic extract of *Berberis Vulgaris* on Cutaneous leishmaniasis (*L. major*) in BALB/c mice. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research.* 2007;5:35-42.
6. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Mahdavi MR, Rahimi F. Antimicrobial effects of methanolic extracts of some spices of *Stachys* and *Phlomis*. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences.* 2007;57:57-66.
7. Rabbani M, Sajjadi SE, Jalali A. Hydroalcohol extract and fractions of *Stachys lavandulifolia* Vahl: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour. *Phytother Res.* 2005;19:854-858.
8. Kukic J, Petrovic S, Niketic M. Antioxidant activity of four endemic stachys taxa. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:725-729.
9. Di Giorgio C, Delmas F, Tueni M, Cheble E, Khalil T, Balansard G. Alternative and complementary antileishmanial treatments: assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. *J Altern Complement Med.* 2008;14:611.
10. Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark JEE, Morgan DR, et al. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution.* 2007;266:5-43.
11. Phipps JB, O'Kennon RJ, Lance RW. Hawthorns and medlars. U.K: Royal Horticultural Society Press; 2003.
12. Glowinski L. The complete book of fruit growing in Australia. Melbourne: Thomas C. Lothian Press; 1991.
13. Safari-Zarafshan M. Child Cultivation in Islam. Tehran: Fateh Press; 1979. [Persian]
14. Shariatifar N, Chamanzari H, Ghanay MS. The study of flos plant on progmastigote in culture. *Ofogh-e-Danesh Journal.* 2006;11:5-9. [Persian]
15. Hejazi SH, Shirani-Bidabadi L, Zolfaghari- Baghbaderani A, Saberi S, Nilforoushzadeh MA, Moradi SH, et al. Comparison effectiveness of extracts of Thyme, Yarrow, Henna and Garlic on cutaneous leishmaniasis caused by *L. major* in animal model (balb/c). *Journal of Medicinal Plants.* 2009;8:129-136. [Persian]

Effect of hydroalcoholic extracts of *Stachys lavandulifolia* Vahl and *Mespilus germanica* leaves on *Leishmania major*

M. Asadi, MSc¹ S. Bahrami, MSc² R. Ansari Samani, PhD³ N. Pakniat, NLD⁴

Master of Parasitology & Mycology¹, Master of Histology, Medical Plant Research Center³, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. PhD Student of Veterinary Parasitology², MD in Veterinary Medicine⁴, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

(Received 22 Sep, 2010 Accepted 5 Nov, 2010)

ABSTRACT

Introduction: *Leishmania major* is the undertaker organism for cutaneous leishmaniasis. The drugs used for the treatment of leishmaniasis have major side-effects or are not effective. *S. Lavandulifolia* and *M. germanica* leaves showed therapeutic effects, however there was no report on leishmanicidal characteristics of these plants. The aim of the study was to assess the leishmanicidal activity of hydroalcohol extracts of *S. Lavandulifolia* and *M. germanica* leaves.

Methods: Aerial parts of *S. Lavandulifolia* and *M. germanica* leaves were collected from Chaharmahal and Bakhtiari province and Shiraz city, and their hydroalcohol extracts were prepared. *Leishmania major* promastigotes were cultured in NNN culture medium. Leishmanicidal effects of these extracts in 50, 100, 250, 500, 1000 microgram per milliliter concentrations were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test.

Results: Results showed that significant difference was between the different concentrations ($P < 0.05$). The mean difference between various groups of *S. Lavandulifolia* was significant between 1000 and 50 ($\mu\text{g/ml}$) groups ($P < 0.05$), while in *M. Germanica* leaf, the mean difference in 50 ($\mu\text{g/ml}$) group ($P < 0.05$) and 100 ($\mu\text{g/ml}$) group ($P < 0.05$) had a significant difference with 1000 ($\mu\text{g/ml}$) group. There was no significant difference between other groups. Also, statistical analysis showed no significant difference between these extracts and have similarity antileishmanial effects.

Conclusion: Our results demonstrated that hydroalcohol extracts of *S. Lavandulifolia* and *M. Germanica* leaves are suitable plants to be assessed for leishmanicidal activity. Therefore, isolation of effective compounds and determination of their structures is recommended.

Key words: *Stachys Lavandulifolia* Vahl - *Mespilus Germanica* Leaf - *Leishmania Major* – In vitro

Correspondence:
M. Asadi, MSc.
Department of Parasitology & Mycology, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
Tel: +98 3813334580
Email: marziasadi234@gmail.com