Archive of SID

Original Article

Evaluation of the Effect of *Achillea biebersteinii afan* Essential Oil on *Leishmania major* Promastigote and Amastigote Growth under In Vitro Conditions

Abdolhossein Dalimi[1*], Mahdi Delavari[2], Iraj Salimi Kia[3]

1- Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Moadares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Parasitology, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
3- Ph.D. Candidate, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacology, Tehran University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Moadares University, Tehran, Iran*
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Received: 22/Dec/2014, Accepted: 10/Feb/2015

Abstract

Objective: Cutaneous leishmaniasis is an endemic disease in certain areas of Iran. The use of pentavalent antimony compounds as first line treatment has been reported, however they are associated with limitations and adverse events. Hence, an attempt to find a new, effective compound has been under consideration. This study examines the effect of *Achillea biebersteinii afan as*, a native plant in Iran, against *Leishmania major* promastigote and amastigote growth under in vitro conditions.

Methods: This experimental study was performed at Tarbiat Modares University in 1392.We extracted the essential oil of the *Achillea biebersteinii afan* plant by steam distillation and analyzed it by gas chromatography mass spectrograph. Then, we evaluated the effect of different concentrations (10%, 15%, 25% and 50%) of the oil on the growth of the promastigotes stage of *Leishmania* and infected macrophages that contained amastigotes under in vitro conditions. Effectiveness of the oil on promastigotes and amastigotes was assessed by direct count and the MTT assay. In all tests, each of the wells that contained culture media and parasites without drug were considered the control group. Data analyses were conducted with ANOVA.

Result: The MTT results indicated significant differences among the number of parasites in the control and case groups treated with 10%, 15%, 25%, and 50% of the oil within 24, 48 and 72 hours after culture. The concentration of 50% of the oil killed 66% of the macrophages that contained amastigotes after 72 hours.

Conclusion: *Achillea biebersteinii afan* oil was effective in killing *Leishmania major* promastigotes and infected macrophages that contained amastigotes. We have proposed to study the extract in vivo for treatment of cutaneous leishmaniasis lesions.

Keywords: *Achillea biebersteinii afan*, *Leishmania major*, Promastigote, Amastigote, MTT

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 2, Pages: 41-51

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله اصیل

ارزیابی اثر اسانس گیاه بومادران زرد بر رشد پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی

عبدالحسین دلیمی[1*]، مهدی دلاوری[2]، ایرج سلیمی کیا[3]

۱- استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۰۱ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۲۱

چکیده

هدف: سالک یا لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های اندمیک در برخی از نقاط ایران است. استفاده از ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی به‌عنوان خط اول درمان، با محدودیت‌ها و عوارض جانبی متعددی گزارش شده است. از این رو همواره تلاش برای یافتن روش‌های درمانی جدید و مؤثر مورد نظر است. در پژوهش حاضر، تأثیر گیاه بومادران که از گیاهان بومی کشور است بر رشد پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. اسانس گیاه بومادران زرد به روش تقطیر با بخار تهیه و تجزیه و تحلیل اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. سپس اثر غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد اسانس گیاه بومادران درشرایط برون تنی روی رشد پروماستیگوت و ماکروفاژ آلوده به آماستیگوت لیشمانیا ماژور بررسی شد. اثر بخشی اسانس گیاه بر پروماستیگوت و آماستیگوت انگل با استفاده از روش شمارش مستقیم و نیز آزمون MTT سنجیده شد در همه آزمون‌ها چاهک حاوی محیط کشت و انگل بدون افزودن دارو به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. و نتایج با استفاده از از آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از کشت انگل، تعداد پروماستیگوت‌ها در گروه‌های کنترل با گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد اسانس گیاه بومادران دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) بوده است. ٦٦ درصد ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت ۷۲ ساعت پس از کشت انگل تیمار شده با غلظت ۵۰ درصد اسانس گیاه از بین رفتند.

نتیجه‌گیری: اسانس گیاه بومادران زرد در از بین بردن پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و ماکروفاژ آلوده به آماستیگوت انگل، اثر مطلوبی دارد؛ بنابراین انجام مطالعه در شرایط درون تنی برای استفاده درمانی از آن برای زخم‌های سالک توصیه می‌شود.

کلیدواژگان: بومادران زرد، لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت، آماستیگوت، MTT

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، صفحات: ۴۱-۵۱

مقدمه

لیشمانیا (*Leishmania*) تک یاخته انگلی از خانواده تریپانوزوماتیده (Trypanosomatidae) و عامل لیشمانیازیس

www.SID.ir

Archive of SID

(Leishmaniasis) است. این بیماری در پنج قاره و ۸۱ کشور جهان به‌صورت اندمیک وجود دارد. سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون مورد جدید از بیماری در جهان گزارش می‌شود. لیشمانیازیس به سه شکل بالینی جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی وجود دارد [۱، ۲]. بر اساس انتشار جغرافیایی، لیشمانیازیس جلدی به دو گروه دنیای قدیم و جدید تقسیم‌بندی می‌شود. عامل لیشمانیازیس جلدی در بیشتر مناطق دنیای قدیم لیشمانیا ماژور (*L.major*) و لیشمانیا تروپیکا (*L.tropica*) است. علایم بالینی به شکل زخمی است که از چند هفته تا چند ماه پس از آلوده شدن شخص ایجاد می‌شود [۳-۵]. برای درمان لیشمانیازیس از ترکیبات آنتی‌موآن (Antimony compounds) استفاده می‌شود. این ترکیبات معمولاً دارای عوارض جانبی است؛ علاوه بر این پس از درمان مواردی از مقاومت دارویی و عود بیماری گزارش شده است [٦، ۷]. گرچه زخم سالک چندان مشکل آفرین نیست واغلب ضایعات آن خود به خود بهبود می‌یابد ولی به‌دلایل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم، نازیبا بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه ارایه روش درمانی آسان، قابل تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به‌نظر می‌رسد [۸، ۹].

مطالعه روی گیاهان دارویی برای یافتن دارویی مناسب علیه انگل لیشمانیا و بیماری لیشمانیازیس از اهمیت بالایی برخوردار است [۱۰]. از سال‌های دور تا به امروز از برخی ترکیبات گیاهی برای درمان زخم‌های لیشمانیایی استفاده می‌شده است. در سال‌های اخیر محققین مختلفی نیز آثار اسانس و یا عصاره برخی گیاهان بومی و محلی خود را علیه انگل در شرایط برون تنی و درون تنی ارزیابی نموده‌اند [۱۱-۲۸].

جنس بومادران (*Achillea*) یکی از مهم‌ترین اجزای خانواده Asteraceae به شمار می‌آید. این خانواده دارای حدود ۸۵ گونه در سراسر جهان است [۲۹، ۳۰]. برخی از این گونه‌ها در طب سنتی برای درمان خونریزی، ذات الریه، دردهای روماتیسمی و زخم پوستی استفاده شده است [۳۱]. نتایج مطالعات سال‌های اخیر نشان می‌دهد که برخی گونه‌های این گیاه دارای اثر ضد میکروبی، ضد آلرژی و ضد التهابی است. علاوه بر این؛ بومادران زرد موجب تسکین درد و جلوگیری از خونریزی می‌شود، همچنین آثار ضد باکتریایی آن به اثبات رسیده است. در گذشته از این گیاه برای ترمیم زخم‌ها استفاده می‌شده است [۳۲-۳٤]. آثار ضد قارچی این گیاه با مطالعه تأثیر آن روی فوزاریوم (*Fusarium*) و آلترناریا (*Alternaria*) اثبات شده است [۳۵، ۳٦]. اسانس گیاه *A. biebersteinii* حاوی موادی مانند آسکاریدول (Ascaridol)، پی‌سیمن (p-cymene)، اکسید کارونون (Carvenone oxide) و کامفور (Camphor) است [۳۷، ۳۸]. علاوه بر مواد فوق؛ گیاه بومادران زرد به‌دلیل خود رو بودن، هزینهٔ کم جمع‌آوری و این که به آسانی در بیشتر نقاط ایران یافت می‌شود مورد توجه برخی محققین قرار دارد. با توجه به این که تاکنون آثار این گیاه علیه انگل لیشمانیا ارزیابی نشده است؛ بنابراین در مطالعه حاضر آثار اسانس این گیاه بر مراحل پروماستیگوت (Promastigote) و آماستیگوت (Amastigote) لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر با طراحی تجربی روی لیشمانیا ماژور سویه استاندارد ایران (MRHO/IR/75/ER) و در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

تهیه اسانس گیاه و تجزیه و تحلیل آن

اندام هوایی گیاه بومادران زرد (*Achillea biebersteinii afan*) در اردیبهشت ماه از استان ایلام جمع‌آوری و پس از شناسایی گیاه توسط گیاه شناس در سایه خشک شد. مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه خشک را در یک بالن ۲ لیتری ریخته و به دستگاه تقطیر متصل شد، عمل حرارت دادن تا زمانی ادامه داده شد که حجم اسانس جمع‌آوری شده ثابت ماند سپس حرارت قطع و اسانس جمع‌آوری شد. بعد از آب‌گیری توسط سولفات سدیم و شناسایی رنگ و بوی اسانس، مقدار آن بر حسب

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر اسانس در ۱۰۰ گرم گیاه خشک تعیین شد.

بررسی اجزای اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی صورت گرفت و ثابت بازداری ترکیبات آن از کتاب مرجع به‌دست آورده شد [۳۹] که در جدول ۱ آورده شده است. دستگاه گاز کروماتوگرافی از نوع Agilent با طول ستون ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر استفاده شد و برنامه دمایی آون از ٦۰ درجه تا ۲٦۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش یافت. میزان اسانس به‌دست آمده از اندام هوایی گیاه ۰/٦ میلی‌لیتر به ازای ۱۰۰ گرم گیاه خشک بود.

جدول ۱ ترکیب اسانس بومادران زرد که به روش گاز کروماتوگرافی-طیف سنج جرمی شناسایی شد.

ترکیبات	شاخص بازداری	درصد
سانتولینا تری ان	۹۰۹	۰/۱۸
آلفا توجن	۹۳۰	۱/٤٥
آلفا پینن	۹۳۹	۱/۸۱
کامفن	۹٥٤	۰/۱
وربنن	۹٦۸	۰/۱۱
سابینن	۹۷٥	٤/۸۷
میرسن	۹۹۱	۰/٥٥
آلفا فلاندرن	۱۰۰۳	۱/٥۲
آلفا تریینن	۱۰۱۷	۲/٥٥
۱و۸ سینئول	۱۰۳۱	۱۲/۲٤
گاما تریینن	۱۰٦۰	۱/۸۸
لینالول	۱۰۹۷	٥/۳٤
بتا توجون	۱۱۱٤	۷/۹٦
۱-تریپنئول	۱۱۳٤	٤/۲۳
ترانس وربنول	۱۱٤٥	۰/۹٦
سیس کریزانتنول	۱۱٦٤	۷/۳۲
آلفا تریپنئول	۱۱۸۹	۲/۱۷
فراگرانول	۱۲۱٦	۱٦/۹۷
پیپریتون	۱۲٥۳	۳/٤۱
لاواندولیل استات	۱۲۹۰	۳/٤۲
تیمول	۱۲۹۰	۱/۱
کارواکرول	۱۲۹۹	۰/۱۹
میرتنیل استات	۱۳۲۷	۰/۱۲
اوژنول	۱۳٥۹	۰/۳۸
سیس جاسمون	۱۳۹۳	۰/۳۳
کاریوفیلن	۱٤۰۹	۰/٦۱
آلفا همولن	۱٤٥٥	۰/۱
بتا سلینن	۱٤۹۰	۰/۱۱
بیسیکلو ژرماکرن	۱٥۰۰	۰/۱٦
اسپاچولنول	۱٥۷۸	۰/٤۱
کاریوفیلن اکساید	۱٥۸۳	۲/٥۱
مجموع		۸٥/۲٤

www.SID.ir

Archive of SID

کشت انگل لیشمانیا ماژور

ابتدا از زخم فعال موش سفید آزمایشگاهی (Balb/c) مبتلا به لیشمانیوزیس جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور نمونه برداشته و به محیط کشت NNN (Novy-MacNeal-Nicolle medium) منتقل شد. لوله‌های حاوی محیط کشت به‌مدت ۵ روز انکوبه شد. به‌منظور کشت و تولید انبوه پروماستیگوت (Mass cultivation)، انگل‌های به‌دست آمده از محیط کشت NNN به محیط کشت مایع RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) پاساژ داده شدند. به‌منظور جلوگیری از آلودگی میکروبی، از آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر) به همراه استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) استفاده شد.

کشت پروماستیگوت‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس بومادران

تعداد 10^6 انگل در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سپس اسانس گیاه بومادران به نسبت ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد به محیط کشت اضافه شد و برای هرغلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. پروماستیگوت‌ها به‌مدت سه روز در ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و تعداد پروماستیگوت‌های زنده در هر چاهک ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ شمارش شد (از هر غلظت، سه چاهک شمارش شد). از محیط کشت RPMI 1640 حاوی انگل بدون اسانس گیاه به‌عنوان شاهد استفاده شد.

تعیین درصد زنده بودن پروماستیگوت با استفاده از آزمایش MTT

تعداد 10^6 انگل در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سپس اسانس گیاه بومادران به نسبت ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد به محیط کشت اضافه شد و برای هرغلظت سه تکرار درنظر گرفته شد. چاهک‌ها در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT [3-(4, 5-methylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی شد.

طبق دستورالعمل کیت، پودر MTT با غلظت ۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر در PBS حل و از فیلتر ۰/۲ عبور داده شد و به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر افزوده شد و سپس پلیت در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به‌مدت ۲-۵ ساعت انکوبه شد. رنگ در داخل میتوکندری سلول زنده در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز تبدیل به کریستال‌های نامحلول بنام فورمازان (Formazan) می‌شود. پس از گذشت ۲-۵ ساعت پلیت با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک به‌عنوان حل کننده فورمازان افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نوری آن‌ها با دستگاه خواننده الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. درصد زنده بودن سلول از طریق فرمول 100×(AT-AB) /(AT-AB) محاسبه شد [۴۰]. در این فرمول AB جذب نوری چاهک بلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با اسانس گیاه است.

جدا کردن ماکروفاژ از صفاق موش

برای جدا کردن ماکروفاژهای صفاقی موش ۳ میلی‌لیتر از PBS استریل به صفاق موش (Balb/c) تزریق و مایع صفاقی موش با سرنگ کشیده شد و سپس مایع صفاقی با دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و عمل شستشو ماکروفاژها با PBS سرد انجام شد. به‌منظور دستیابی به تعداد ماکروفاژ مورد نیاز این روش چندین بار تکرارشد.

تعیین درصد زنده بودن ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت لیشمانیا ماژور

تعداد 10^5 ماکروفاژ در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد در پلیت ۹۶ خانه به همراه ۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. برای آلوده کردن ماکروفاژها تعداد 10^6 پروماستیگوت انگل در مرحله ایستایی به چاهک‌های حاوی ماکروفاژ افزوده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. ۶ ساعت بعد، برای حذف ماکروفاژهای نچسبیده و پروماستیگوت وارد نشده به سلول، مایع رویی چاهک دور ریخته شد و محیط کشت تازه اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت اسانس گیاه بومادران به نسبت ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد به محیط کشت اضافه شد. پس از سپری شدن سه زمان مورد نظر (۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت) طبق دستورالعمل کیت، پودر MTT با غلظت ۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر در PBS حل شده و از فیلتر ۰/۲ عبور داده شد و به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر افزوده و سپس پلیت در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به‌مدت ۲–۵ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت ۲–۵ ساعت مایع رویی دور ریخته شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO به‌عنوان حل کننده فورمازان افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نوری آن‌ها با دستگاه الایزا خوان (ELISA Reader) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و درصد زنده بودن سلول محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه نتایج اثر بخشی غلظت‌های مختلف در زمان‌های متفاوت گروه‌های آزمون و کنترل از روش ANOVA و نرم‌افزارSPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

نتایج

۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت انگل، تعداد پروماستیگوت‌های زنده تیمار شده با اسانس بومادران در هر چاهک با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ شمارش شد. طبق نتایج به‌دست آمده، با افزایش غلظت اسانس گیاه، تعداد پروماستیگوت در سه زمان مورد نظر پس از کشت کاهش یافت. کم‌ترین تعداد شمارش شده انگل مربوط به غلظت ۵۰ درصد بود که در این غلظت ۷۲ ساعت پس از کشت تعداد انگل به حداقل پروماستیگوت در هر میلی‌لیتر کاهش یافت (جدول ۲).

جدول ۲ تعداد پروماستیگوت‌های انگل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن غلظت‌های اسانس بومادران

غلظت‌های اسانس بومادران	تعداد انگل		
	۲۴ ساعت پس از کشت	۴۸ ساعت پس از کشت	۷۲ ساعت پس از کشت
۱۰ درصد	۱۱۱۳۳۳۳	۷۶۰۰۰۰	۶۴۰۰۰۰
۱۵ درصد	۹۸۶۶۶۶/۶	۶۷۳۳۳۳/۳	۴۹۳۳۳۳/۳
۲۵ درصد	۴۵۳۳۳۳/۳	۲۵۳۳۳۳/۳	۱۷۳۳۳۳/۳
۵۰ درصد	۲۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۶۶۶۶/۶
کنترل	۱۲۴۰۰۰۰	۱۳۸۶۶۶۷	۱۵۲۰۰۰۰

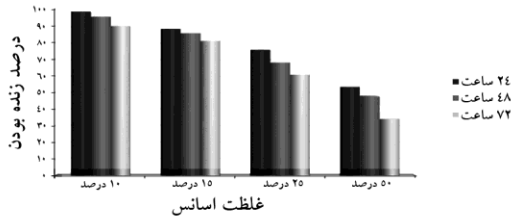
جدول ۳ درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های انگل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن غلظت‌های اسانس بومادران

غلظت‌های اسانس بومادران	درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها		
	۲۴ساعت پس از کشت	۴۸ ساعت پس از کشت	۷۲ ساعت پس از کشت
۱۰ درصد	۸۴/۶	۸۲	۷۵
۱۵ درصد	۸۱/۳	۷۵/۶	۶۹/۳
۲۵ درصد	۶۳/۳	۵۹/۳	۵۳/۶
۵۰ درصد	۳۹/۶	۲۴/۶	۱۳/۶

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد کـه ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از کشت انگل، درصد زنده بودن پروماستیگوت‌ها در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ١٠، ١٥، ٢٥ و ٥٠ درصد از عصاره با افزایش زمان و غلظت عصـاره کـاهش مـی‌یابـد (جدول ٣). ٦٦ درصد ماکروفاژهای آلوده به آماسـتیگوت ٧٢ ساعت پس از کشت انگل تیمار شـده بـا غلظـت ٥٠ درصـد اسانس گیاه از بین رفتند (شکل ١).



شکل ١ درصد زنده بودن ماکروفاژهای آلوده به آماسـتیگوت لیشـمانیا مـاژور پس از مواجه با غلظت‌های مختلف اسانس بومادران

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس گیاه بومادران آثـار درمانی مطلوبی روی پروماستیگوت و نیز ماکروفاژ آلـوده بـه آماستیگوت دارد در این مطالعه برخلاف اکثر مطالعـات کـه از عصاره گیاهان استفاده می‌شود از اسانس گیاه بومادران استفاده شد. میزان اثر بخشی نتایج حاصل از این مطالعه نشـان داد کـه اسانس گیاه بومادران باعث کاهش تعداد پروماسـتیگوت‌هـای لیشمانیا ماژور می‌شود. مقایسه تعداد انگل در گروه کنتـرل بـا گروه‌های آزمون در زمان‌های مختلف نشان داد که اثر بخشی اسانس بومادران بر پروماستیگوت‌های انگل وابسته به غلظت و زمان است و با افزایش غلظت اسانس بومادران و زمان تـأثیر، تعداد انگل نیز کاهش می‌یابـد. ٢٤ سـاعت پـس از کشـت در بالاترین غلظت استفاده شده تعداد پروماسـتیگوت‌هـا بـه ٢٠٠ هزار کاهش یافت در حالی که در گروه کنترل ایـن تعـداد بـه ١٢٤٠٠٠٠ رسید و پـس از ٧٢ سـاعت تعـداد انگـل بـه ٦٦٦٦ کاهش یافت که نشـان دهنـده اثـر بخشـی مطلـوب اسـانس بومادران بر پروماستیگوت‌های انگل است. نتایج آزمون MTT نیز نشان داد با افزایش غلظت اسانس گیاه و نیز افزایش زمـان انکوباسیون درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌های انگل کاهش می‌یابد؛ به‌طوری که در غلظت ٥٠ درصد و ٧٢ ساعت پس از کشت این میزان به زیر ١٥ درصد رسید و نتایج به‌دست آمده از این آزمون با روش شمارش همخوانی داشـت. بررسـی زنـده ماندن ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا نیز بـه خـوبی نشـان داد کـه اسانس بومادران اثر ممانعت کننـدگی در رشـد ماکروفاژهـای آلوده به لیشمانیا ماژور دارد و با افزایش غلظت اسانس گیاه این تأثیر بیشتر می‌شود. گیاه بومادران به‌دلیل داشتن برخی ترکیبات لاکتونی دارای آثار ضد میکروبی و ضـد التهـابی اسـت [٤١]. همچنین این گیـاه بـه سـبب داشـتن ترکیبـات مـؤثر از قبیـل فلاونوئیـدها دارای خاصـیت ضـد التهـابی، ضـد میکروبـی و آنتی‌اکسـیدانی اسـت [٣٢، ٤١]. امـروزه اسـتفاده از داروهـای گیاهی در درمان بیماری‌های انگلی و به‌خصوص لیشمانیازیس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در سال‌های اخیر از اسانس و عصاره گیاهان مختلفی برای درمان سالک استفاده شده است. استفاده از عصاره ترخون، گزنه، درمنه، باریجه، مورد، سـیر و اوکالیپتوس برای درمان لیشمانیوزیس جلدی در موش سوری مؤثر گزارش شده است [٤٢]. در یک مطالعه اثر بخشی عصاره گیاه فلوس به‌صورت ژل به همراه تزریق گلوکانتیم در محـل زخم بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ١/٦٧ درصد در مقایسه با گلوکانتیم تنها (٤/٤١ درصد) گزارش شده است [٤٣].

توما (Toma) و همکاران عصاره *Nigella damascene*؛ کاستیلو (Castillo) و همکاران عصاره *Himatanthus sucuuba*؛ سین (Singh) و همکاران عصاره *Desmodium gangeticum*؛ گرمونپرز (Germonprez) و همکاران عصاره *Maesa balansae*؛ سیرافیان پور و همکاران عصاره *Perovskia abrotanoides*؛ غضنفری و همکاران عصاره سیر و تاندون (Tandon) و همکاران عصاره *Nyctanthes arbortristis* را علیه لیشمانیا مطالعه کرده‌اند [١٢، ١٤، ١٨-٢١، ٢٤]. علاوه بر این؛ پرازا- سـانچز (Peraza-

www.SID.ir

Archive of SID

Sanchez) و همکاران و مارتین (Martin) و همکاران عصاره گیاهان بومی اسپانیا؛ نژاکو – لنتا (Ndjako-Lenta) و همکاران عصاره گیاهان بومی کامرون؛ مسکوئیتا (Mesquita) و همکاران عصاره گیاهان بومی برزیل؛ تاسدمیر (Tasdemir) و همکاران عصاره گیاهان بومی ترکیه؛ سینگا (Singha) و همکاران عصاره گیاهان بومی هند؛ ابرو (Abreu) و همکاران عصاره گیاهان بومی گینه بیسائو را از لحاظ خاصیت لیشمانیا کشی مطالعه نموده‌اند [۱۳، ۱۵ –۱۷، ۲۵، ۲۷، ۲۸]. از آن‌جا که داروهای گیاهی از لحاظ قیمت مقرون به صرفه است و نیز معمولاً عوارض داروهای شیمیایی را ندارند می‌توانند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشند. در این زمینه توجه به این نکته که داروهای گیاهی مورد بررسی بومی کشور باشند از اهمیت بالایی برخوردار است. بومادران گیاه بومی کشور ایران است و در اکثر مناطق ایران رشد می‌کند. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که اسانس این گیاه در شرایط آزمایشگاهی اثر بخشی مطلوبی بر لیشمانیا ماژور دارد؛ بنابراین بررسی آثار این گیاه در شرایط درون تنی برای درمان عارضه لیشمانیای پوستی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Kaur S, Patel H, Sharma V, Garg P, Roy N. LeishBase: *Leishmania major* structural database. IJIB 2009; 7(2): 63-8.

[2] Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol 2000; 25(5): 363-70.

[3] Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science 1984; 223(4643): 1417-9.

[4] Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. Adv Parasitol 1992; 31: 175-254.

[5] Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis 1996; 22(1): 1-13.

[6] Pujals G, Suñé-Negre JM, Pérez P, García E, Portus M, Tico JR, Miñarro M, Carrió J. In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. Parasitol Res 2008; 102(6): 1243-7.

[7] Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg 1992; 46(3): 296-306.

[8] Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997; 24(4): 684-703.

[9] Brodskyn C, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. Expert Rev Vaccines 2003; 2(5): 705-17.

[10] Luize PS, Tiuman TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Garcia Cortez DA, Palazzo de Mello JC, Nakamura CV. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Cienc Farm 2005; 41(1): 85-94.

www.SID.ir

Archive of SID

[11] Dutta A, Mandal G, Mandal C, Chatterjee M. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: a potential herbal therapy in leishmaniasis. Glycoconj J 2007; 24(1): 81-6.

[12] Toma CC, Ollivier E, Delmas F, DiGiorgio C, Balansard G. Anti-leishmaniasis activity of some extracts isolated from *Nigella damascena* (Ranunculaceae). Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 2007; 111(1): 285-9.

[13] Peraza-Sánchez SR, Cen-Pacheco F, Noh-Chimal A, May-Pat F, Simá-Polanco P, Dumonteil E, García-Miss MR, Mut-Martín M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the *Yucatan peninsula*. Fitoterapia 2007; 78(4): 315-8.

[14] Castillo D, Arevalo J, Herrera F, Ruiz C, Rojas R, Rengifo E, Vaisberg A, Lock O, Lemesre JL, Gornitzka H, Sauvain M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). J Ethnopharmacol 2007; 112(2): 410-4.

[15] Ndjakou Lenta B, Vonthron-Sénécheau C, Fongang Soh R, Tantangmo F, Ngouela S, Kaiser M, Tsamo E, Anton R, Weniger B. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2007; 111(1): 8-12.

[16] Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(7): 783-7.

[17] Tasdemir D, Brun R, Perozzo R, Dönmez AA. Evaluation of antiprotozoal and plasmodial enoyl-ACP reductase inhibition potential of Turkish medicinal plants. Phytother Res 2005; 19(2): 162-6.

[18] Singh N, Mishra PK, Kapil A, Arya KR, Maurya R, Dube A. Efficacy of *Desmodium gangeticum* extract and its fractions against experimental visceral leishmaniasis. J Ethnopharmacol 2005; 98(1-2): 83-8.

[19] Germonprez N, Maes L, Van Puyvelde L, Van Tri M, Tuan DA, De Kimpe N. In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from Maesa balansae and some chemical derivatives. J Med Chem 2005; 48(1): 32-7.

[20] Sairafianpour M, Christensen J, Staerk D, Budnik BA, Kharazmi A, Bagherzadeh K, Jaroszewski JW. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from Perovskia abrotanoides: new source of tanshinones. J Nat Prod 2001; 64(11): 1398-403.

[21] Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. Scand J Immunol 2000; 52(5): 491-5.

[22] Akendengue B, Ngou-Milama E, Laurens A, Hocquemiller R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. Parasite 1999; 6(1): 3-8.

[23] França F, Lago EL, Marsden PD. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1996; 29(3): 229-32.

[24] Tandon JS, Srivastava V, Guru PY. Iridoids: a

www.SID.ir

Archive of SID

new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*. J Nat Prod 1991; 54(4): 1102-4.

[25] Singha UK, Guru PY, Sen AB, Tandon JS. Antileishmanial activity of traditional plants against *Leishmania donovani* in golden hamsters. Int J Pharmacog 1992; 30(4): 289-95.

[26] Iwu MM, Jackson JE, Tally JD, Klayman DL. Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radio-respirometric microtechnique (RAM). Planta Med 1992; 58(5): 436-41.

[27] Martin T, Villaescusa L, Gasquet M, Delmas F, Bartolome C, Diaz-Lanza AM, Ollivier E, Balansard G. Screening for protozoocidal activity of spanish plants. Pharm Biol 1998; 36(1): 56-62.

[28] Abreu PM, Martins ES, Kayser O, Bindseil KU, Siems K, Seemann A, Frevert J. Antimicrobial, antitumor and antileishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. Phytomedicine 1999; 6(3): 187-95.

[29] Abu-Romman S. Comparison of methods for isolating high quality DNA from sage (*Salvia officinalis*). J Med Plant Res 2011; 5(6): 938-41.

[30] Chevalier A. The encyclopedia of medicinalplants. London: Dorling Kindersley, 1996; p: 102-5.

[31] Al-Qura'n S. Taxonomical and pharmacological survey of therapeutic plants in Jordan. J Nat Prod 2008; 1: 10-26.

[32] Baris O, Güllüce M, Fikrettin S, Özer H, Kiliç H, Özkan H, Sökmen M, Özbek T. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii afan*. (Asteraceae). Turk J Biol 2006; 30: 65-73.

[33] Saeidnia S, Gohari AR, Kiuchi F, Honda G. Effects of some fractions from *Achillea biebersteinii* and *A.millefolium* on the epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. IJPR 2004; 3(Suppl 2): 78-79.

[34] Mercan Doğan N, Cansaran A, Acar G, Öztekin M. Antimicrobial activity of extracts of some plants from Amasy (Turkey). ABR 2010; 1(1): 87-91.

[35] Kordali S, Cakir A, Akcin TA, Mete E, Akcin A, Aydin T, Kilic H. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii afan*. (Asteraceae). Industrial Crops and Products 2009; 29: 562-70.

[36] Aburjai T, and Hudaib M. Antiplatelet, antibacterial and antifungal activities of *Achillea falcata* extracts and evaluation of volatile oil composition. Pharmacognosy Magazine 2006; 2(7): 191-8.

[37] Toncer O, Basbag S, Karaman S, Diraz E, Basbag M. Chemical composition of the essential oils of some *Achillea* species growing wild in Turkey. Int J Agric Biol 2010; 12: 527-30.

[38] Bader A, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Essential oil composition of *Achillea santolina* and *Achillea biebersteinii afan* collected in Jordan. Flavour Fragr. J 2003; 18(1): 36-8.

[39] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Carol Stream, IL 60188, USA, 2001; Available at: http://link.springer.com/article/10.1016%2Fj.jasms.2005.07.008?LI=true.

www.SID.ir

Archive of SID

[40] Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sadraei J. In vitro study on cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). Iran J Parasitol 2014; 9(1): 6-13.

[41] Tozyo T, Yoshimura Y, Sakurai K, Uchida N, Takeda Y, Nakai H, Ishii H Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1994; 42(5): 1096-100.

[42] Babaee Khou L, Mohebali M, Niakan Lahiji M, Mehrabi Tavana A. The therapeutic effects of *Eucalyptus*, *Myrtus*, *Ferula*, *Aretmisia*, *Allium* and *Urtica* extracts against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmanaia major* in small white mice (out- bred). Hakim Research Journal 2007; 10(2): 21-7. (Persian)

[43] Jaffary F, Nilforoushzadeh MA, Ansari N, Rahimi M. Treatment of cutaneous leishmaniasis: cassia fistula fruit gel- intralesional glucantime Vs placebo gel- intralesional glucantime combination. Tehran University of Medical Sciences 2010; 67(10): 705-11. (Persian)

www.SID.ir