مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هشتم ● شماره ۳ ● صفحات ۱۶۶ تا ۱۷۲ ● پاییز ۱۳۸۹

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 شریفی‌فر[۳]

تاریخ اعلام وصول: ۸۹/۲/۱۴ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۵/۲۴

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. اخیرا 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 ۲۵±۲°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 تترازولیوم (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 وعصاره‌های دیگر دارای تاثیر بیشتری می‌باشد، به طوری که میزان IC_{50} داروی تارتارامتیک (کنترل) برابر با ۴/۷ µg/ml می‌باشد. همچنین میزان IC_{50} عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه به ترتیب µ g/ml ۷/۵، ۵/۹ و ۳/۶، 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

لیشمانیوز یک بیماری گرمسیری ناشی از انگل داخل سلولی از جنس لیشمانیا می‌باشد (۱، ۲). این بیماری در سراسر جهان منجمله ایران انتشار دارد (۳)، به طوری که بروز این بیماری در افراد نظامی

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

www.SID.ir

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، مواجه افراد غیر ایمن، تخریب شرایط محیطی و اکولوژیکی، سوء تغذیه و همراهی با HIV رو به افزایش می‌باشد (۵).

درمان دارویی لیشمانیوز عمدتا 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.

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 انقوزه (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 نحوه‌ی 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

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲- گیاه انقوزه

شکل ۳- گیاه پنبه

تهیه کنترل

از داروی تارتارامتیک ۳- oxide tartrate (Potassium antimony hemihydrate) به‌عنوان 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 لیشمانیا 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 لیشمانیا ماژور در محیط کشت (Gibco-BRL) RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله و ۱۰۰ lu/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتوما یسین (Gibco-BRL)، در دمای ۲۵±۲ c° کشت داده شد. سپس پروما ستیگوتهایی که در محیط کشت به فاز ثابت رشد (Stationary-phase) رسیدند با استفاده از لام هموسیتومتر در زیر میکروسکوب شمارش و به تعداد 5×10^5/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 [۳-(۴,۵-dimethylthiazol-۲-yl)-۲,۵-diphenyl Tetrazolium bromide]MTT (Tetrazolium salt) 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 داروئی به کار می‌رود (۱۸). برای تهیه محلول MTT، ۵ میلی گرم از پودر MTT را در ۱ میلی لیتر محلول PBS استریل (5mg/ml) حل می‌کنیم.

اضافه کردن پروماستیگوت‌ها، دارو و عصاره‌ها به پلیت

از پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور موجود در محیط کشت که در فاز ثابت رشد (Stationary phase) هستند به میزان ۱۰۰µl 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 ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد و به میزان ۱۰µl 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 ۱۰۰µl 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 ۱۰٪ حجم هر چاهک از محلول ذخیره MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) که قبلا تهیه شده بود به داخل هر چاهک ریخته شد.

Archive of SID
www.SID.ir

چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰µl محیط کشت و فقط حاوی ۱۰µl از محلول MTT می‌باشد. متعاقبا پلیتها به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۲۵±۲ °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 ۱۰۰µl 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 ۴۹۲ nm با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader) قرائت گردید و جذب نوری (Optical density, OD) بدست آمد. سپس میزان IC۵۰ (۵۰٪ Inhibitory concentrations) یعنی غلظتی از عصاره که از رشد ۵۰٪ ارگانیسم 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- dunnett جهت تعیین اثر بخشی داروی کنترل و عصاره‌ها، مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، سطح معنی‌دار P<۰/۰۵ 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 الایزا ریدر (ELISA reader) و جذب نوری (OD) بدست آمده براساس فرمول زیر میزان IC۵۰ با نرم افزار EXCEL محاسبه گردید:

$$\text{Log (IC۵۰)} = \log (x1) + [\,(y1 - y۰/۲) / (y1 - y۲)\,]\,[\log (x۲) - \log (x1)\,]$$

در فرمول فوق y۱ مقدار انگل درغلظت x۱ و همه غلظتهای کمتر و y۲ مقدار انگل در غلظت x۲ و همه غلظتهای بیشتر می‌باشد. همچنین y۰ مربوط به جذب نوری گروه کنترل است که نشان‌دهنده مقدار انگل مربوط به کنترل می‌باشد.

یافته‌ها

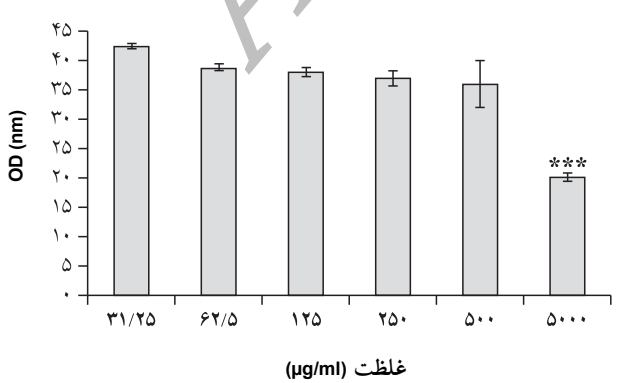
در این بررسی ابتدا غلظتهای مختلف داروی کنترل (تارتارامتیک) تهیه و اثر ضد لیشمانیایی آن تعیین شد که از نظر آماری بین تاثیر غلظتهای مختلف (۳۱/۲۵-۵۰۰۰ µg/ml) اختلاف معنی‌داری (P < ۰/۰۰۱) مشاهده شد و این اختلاف در آزمون Post Hoc مربوط به اختلاف در غلظت ۵۰۰۰µg/ml با سایر غلظت‌ها می‌باشد که نشاندهنده آن است که این دارو رشد پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور را مهار می‌کند (نمودار ۱). با توجه به اینکه اثر غلظت ۵۰۰۰µg/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 ۵۰۰۰µg/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<۰/۰۰۱) نشان داد که در غلظت‌های ۲۵/۳۱ µg/ml، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) میانگین جذب نوری بالاتر بود و در آزمون Post Hoc اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های فوق و گروه کنترل دیده شد (نمودار۲).

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آنقوزه بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور

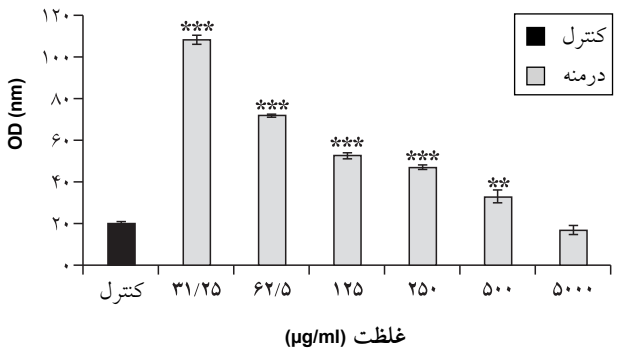
میانگین جذب نوری بین عصاره آنقوزه و داروی کنترل اختلاف معنی‌داری (P< ۰/۰۰۱) نشان داد که این عصاره در غلظت µg/ml ۳۱/۲۵ به طور معنی‌داری (P< ۰/۰۰۱) دارای میانگین جذب نوری بالاتر ودر بقیه غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۳).



*** تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۵۰۰۰ g/mlµ با سایر غلظت‌ها مشاهده شد (P< ۰/۰۰۱).
OD: جذب نوری

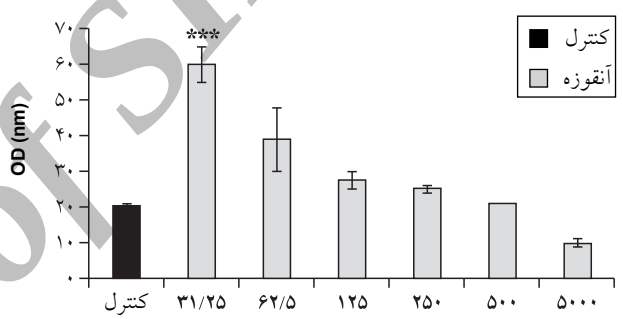
نمودار ۱- مقایسه میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف داروی کنترل بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

Archive of SID
www.SID.ir



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

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



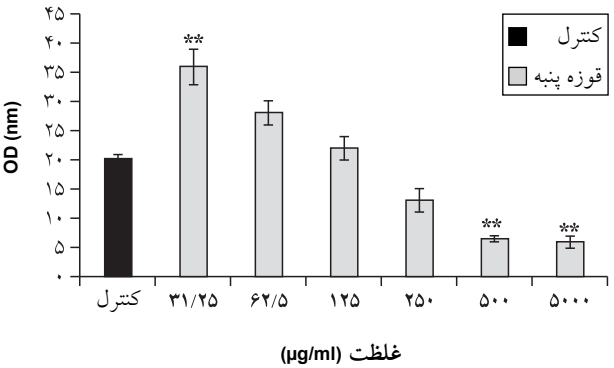
*** (P< ۰/۰۰۱) کنترل: داروی تارتارامتیک OD: جذب نوری

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

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره قوزه پنبه بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور

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

در روش MTT با تاثیر عصاره‌ها و داروی کنترل بر روی پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور، IC۵۰ بین ۷/۵ µg/ml-۳/۶ بدست آمد، به طوری که IC۵۰ برای داروی کنترل ۴/۷ µg/ml محاسبه شد که نشان‌دهنده تاثیر تارتارامتیک در غلظت ۴/۷ µg/ml است. همچنین IC۵۰ 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.



** (P< ۰/۰۱) کنترل: داروی تارتارامتیک OD: جذب نوری

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

بحث و نتیجه‌گیری

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

جهت بررسی رشد و زنده بودن پروماستیگوتهای لیشمانیا 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 تترازولیوم، 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 (تارتارامتیک) که فرم سه ظرفیتی آنتی موان است در مقایسه با اشکال پنج ظرفیتی ترکیبات آنتی موان ازجمله، مگلومین 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 تارتارامتیک نسبت به مگلومین آنتی مونات علیه پروماستیگوت و

Archive of SID
www.SID.ir

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

بنابراین در این تحقیق جهت مقایسه فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره‌های مختلف گیاهی بر روی پروماستیگوتهای 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 دارورویی 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 مهاری بر روی پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور افزایش می‌یابد و کاهش جذب نوری (OD) نشان‌دهنده این اثر مهاری 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 معنی‌داری 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 µg/ml داروی کنترل که بهترین پایش را در مهار رشد انگل لیشمانیا ماژور از خود نشان داد، به عنوان ملاک قیاس انتخاب گردید، لزا مقایسه این رقت (۵۰۰۰ µg/ml) 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 ۳۱/۲۵µg/ml، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ ، ۵۰۰ بی تاثیر می‌باشد و تنها در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml با داروی کنترل هم خوانی دارد. از طرفی عصاره قوزه پنبه که بهترین اثر را از خود نشان داد فقط در غلظت ۳۱/۲۵µg/ml بی‌تأثیر بود و در غلظت‌های دیگر با داروی کنترل هم خوانی داشت، به طوریکه در غلظت ۵۰۰ و۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به داروی کنترل، موثرتر بود.

همچنین مقایسه IC۵۰ بین عصاره‌ها و داروی کنترل نشان می‌دهد که عصاره قوزه پنبه نسبت به داروی کنترل دارای IC۵۰ کمتری است و در نتیجه در مقایسه با داروی کنترل تاثیر بهتری دارد، در صورتی که سایر عصاره‌ها که IC۵۰ 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

بدین‌وسیله 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 IC۵۰ تشکر و قدردانی می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

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, Ouaissi 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

Barati. M; PhD Student[1], *Sharifi. I; PhD[2], Sharififar. F; PhD[3]

Received: 4 May 2010 Accepted: 15 Aug 2010

Archive of SID

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.

Kaywords: 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 Parasitelogy 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.

www.SID.ir