www.SID.ir

ارزیـــــــــابی کشندگی عصاره ی الکلی و آبی گل همیشه بهار(*Calendula officinalis*) بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور(MRHO/IR/75/ER) در شرایط آزمایشگاهی

ناهید ماسپی[۱]، فاطمه غفاری‌فر*[۲]، علی محمد بهرامی[۳]، صیاد بسطامی نژاد[۱]، مرتضی شمسی[٤]

۱) گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۲) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳) گروه پاتوبیولوژی، آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام
۴) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۰ **تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۳**

چکیده

مقدمه: گل همیشه بهار از خانواده کاسنیان است که از آن در درمان اختلالات پوستی، درد و نیز به عنـــوان باکتری‌کش، ضد عفونی کننده و ضد التهاب استفاده شده است. در این مطالعه اثر کشندگی گل مزبور با غلظت‌های مختلف بر پروماستیگوت‌های لیشمانیاماژور در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

مواد و روش ها: در ابتدا گل‌های خشک و خرد شده این گیاه با خیـساندن در الکـل ۸۰٪ عـصاره‌گیـری شـدند و بـا استفاده از دستگاه تبخیـر، الکـل آن تبخیـر شـد. غلظـت هـای مختلـف عـصاره(۵۰۰µg/ml، ۲۵۰µg/ml، ۱۲۵ µg/ml، ۶۲/۵µg/ml) در آزمایشگاه تهیه و تعداد ۵۰/۰۰۰ پروماستیگوت در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شـد؛ سـپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به هر چاهک اضافه گردید و به مدت سه روز در دمای ۲۴ درجه انکوبه شد. تعداد انگل‌ها در هـر چاهـک بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با لام نئوبار شمارش و از محیط کشت RP بدون عصاره به عنوان شاهد استفاده گردید.

یافته‌های پژوهش: نتایج نشان داد که عصاره مزبور در غلظت ۵۰۰µg/ml تمام انگل‌ها را کشته و غلظت‌های کـم تر، فعالیت ضد لیشمانیایی وابسته به دوز نشان دادند که IC50 پـــس از ۲۴ ساعت در عـصاره الکلـی و آبـی بـه ترتـــیب ۱۷۰ µg/ml و ۲۱۵µg/ml به دست آمد. تعداد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شاهد در ۷۲،۴۸،۲۴ ساعت بـه ترتیـب افزایش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج مطالعه کنونی، عصاره گل همیشه بهار اثر لیـشمانیاکـشی خـوبی دارد و احتمـالاً می‌تواند در درمان لیشمانیوز به کار رود.

واژه های کلیدی: لیشمانیا ماژور، گل همیشه بهار، عصاره گیاهی، Calendula officinalis

***نویسنده مسئول:** گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

Email: ghafarif@modares.ac.ir

www.SID.ir

www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوزها گسترش جهانی داشته و از مهم ترین بیماری های منتقله ی ناقلین به شمار می روند که عامل آن ها گونه های مختلف انگل جنس لیشمانیا می باشد. گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا منجر به لیشمانیوز جلدی، جلدی-مخاطی، احشایی و حتی بیماری سیستمیک شدیدی می‌شود که در صورت عدم درمان کشنده می‌باشد. این انگل در ۸۸ کشور جهان، اعم از دنیای قدیم(عمدتاً شمال و شرق آفریقا، خاورمیانه، آسیا و جنوب اروپا) و دنیای جدید (مرکز و جنوب آمریکا) وجود دارد. شیوع جهانی لیشمانیوزها ۱۲ میلیون نفر و بروز سالیانه آن ۵۰۰ هزار مورد می‌باشد.(۱)

مواد طبیعی یا ترکیبات مشتق از گیاهان به صورت گسترده ای در مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری زا به کار می‌روند،(۲).گل همیشه بهار، از خانواده کاسنیان است که در درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها و در ترکیب با داروهای هموپاتیک استفاده شده است،(۳). و تاریخچه مصرف آن در پزشکی به قرن دوازدهم بر می‌گردد،(۴). حتی از این گیاه به عنوان داروی سنتی در رژیم های غذایی استفاده شده است،(۵). اخیراً به عنوان ضد التهاب برای استعمال خارجی و ترمیم زخم به صورت فزاینده‌ای استفاده می‌شود،(۶،۷،۸). خواص دارویی فراوانی شامل آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد باکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی برای این گیاه گزارش شده است،(۹،۱۰،۱۱،۱۲). از طرفی به فعالیت سایتوتوکسیک و نیز کاهش تومور این گیاه نیز اشاره شده است،(۱۳). مصرف خوراکی گل همیشه بهار را در افزایش قاعدگی، درمان تب و درمان سرطان موثر دانسته اند،(۱۴). جوشانده همیشه بهار در شستن چشم‌ها، غرغره کردن یا درمان ورم ملتحمه، التهاب گلو، استوماتیت افتوس، التهاب دهان و لثه، راش‌های قنداق و دیگر موارد التهابی پوست و غشاهای مخاطی استفاده شده است،(۱۵،۱۶). در هندوستان ترکیبات گیاهی حاوی گل همیشه بهار به طور موضعی و در درمان هموروئید به کار می رفته است،(۱۷). فلانوئیدهای جدا شده از گل همیشه بهار دارای خاصیت ضد میکروبی بر استافیلوکوک اورئوس و کلبسیلا پنومونیه می‌باشند و عصاره آلی گل‌های خشک شده همیشه بهار باعث کاهش فعالیت HIV-1 reverse transcription می‌شود.

مواد و روش ها

آماده کردن عصاره الکلی گل همیشه بهار

گل‌های خشک همیشه بهار از عطاری خریداری و با استفاده از آسیاب برقی کاملاً خرد شد. سپس ۵۰ گرم از ماده آسیاب شده به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل ۸۰ درجه اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر الکل، دهانه ارلن با پارافیلم بسته شد. سپس مایع شفاف رویی جدا و رسوب ته ارلن دور ریخته شد. مایع رویی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ و مجدداً مایع رویی جداسازی و در دستگاه تقطیر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا الکل اضافی جدا شود. عصاره باقی مانده با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر به عنوان محلول ذخیره تهیه گردید و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه در ظروف تیره نگهداری شد.

تهیه عصاره آبی

این روش همانند تهیه عصاره الکلی است ولی به جای الکل از آب به عنوان حلال استفاده شد و پس از سانتریفوژ، مایع رویی با استفاده از دستگاه لیوفلیزه گردید و از عصاره باقیمانده محلول ذخیره با غلظت mg/ml ۵ در محیط RPMI تهیه و تا هنگام استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت انگل

پروماستیگوت‌ها لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI 1640 در °C ۲۴ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله(FCS) و آنتی بیوتیک جنتامایسین کشت داده شد و پس از ۷۲ ساعت از آن ها کشت بعدی صورت گرفت. در پی آن تهیه شد سپس پروماستیگوت های انگل در معرض غلظت های افزاینده همیشه بهار قرار گرفت و اثر کشندگی آن بر انگل‌ها بررسی شد.

ارزیابی اثر ضد لیشمانیایی عصاره

پروماستیگوت‌های فاز ایستایی لیشمانیا ماژور در میکروپلیت‌های کشت ۹۶ خانه حاوی محیط کشت RPMI، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و µg/ml ۱۰۰ جنتامایسین کشت داده شد(۱۰۴×۵ انگل در هر چاهک). سپس با µl ۱۰۰ از غلظت‌های مختلف عصاره همیشه بهار(µg/ml۶۲/۵، µg/ml۱۲۵، µg/ml۲۵۰، µg/ml۵۰۰) تیمار گردید. پروماستیگوت‌ها به مدت سه روز در

°C ۲۴ انکوبه شدند و تعداد پروماستیگوت‌های زنده در هر چاهک پس از روزهای اول، دوم و سوم با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ شمارش گردید(از هر غلظت، سه چاهک شمارش شد). از محیط کشت RPMI بدون عصاره به عنوان شاهد استفاده شد.

www.SID.ir

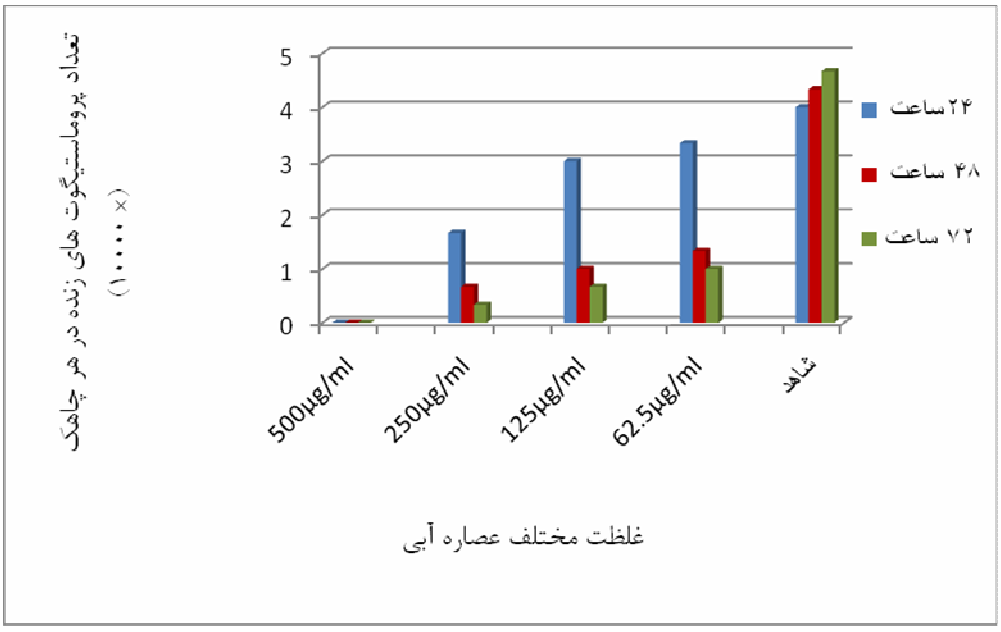
www.SID.ir

یافته‌های پژوهش

درصد پروماستیگوت‌های کشته شده با مقایسه میزان رشد گروه تیمار و شاهد سنجیده شد. درصد IC50 به عنوان غلظتی از عصاره که باعث ۵۰ درصد مهار رشد پروماستیگوت‌ها پس از ۲۴ ساعت می‌شود تعریف گردید. نتایج نشان داد که هر دو عصاره دارای اثر مهاری بر رشد پروماستیگوت‌ها بودند و غلظت مهاری ۵۰ درصد به ترتیب برای عصاره الکلی و آبی ۱۷۰ و ۲۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در غلظت ۵۰۰µg/ml عصاره الکلی، پس از ۲۴ ساعت، تمام پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و در همین غلظت از عصاره آبی، ۷۵ درصد پروماستیگوت ها کشته شدند و فعالیت لیشمانیا کشی وابسته به دوز در دوزهای پایین تر نیز دیده شد. اما تعداد پروماستیگوت‌ها در نمونه شاهد پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب سیر فزاینده‌ای داشت(جدول۱) که میانگین تعداد انگل ها در غلظت های مختلف پس از هر سه روز محاسبه گردید.(نمودار ۱ و۲)

جدول ۱. مقایسه اثر کشندگی غلظت های مختلف عصاره ی الکلی و آبی گل همیشه بهار بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

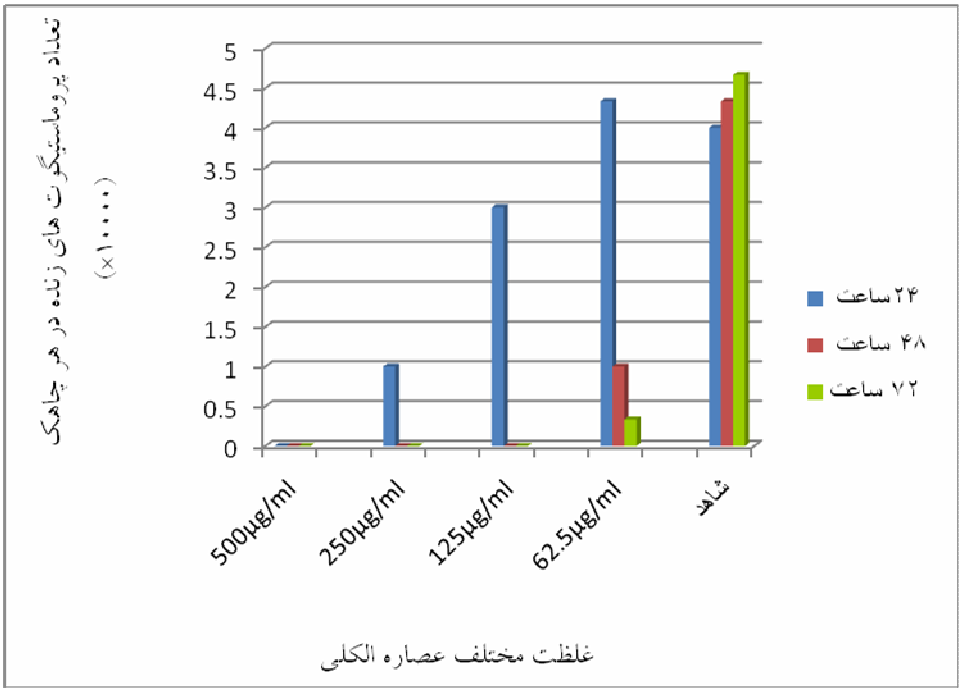
نوع عصاره	درصد پروماستیگوت های کشته شده پس از مواجهه با عصاره گیاهی			غلظت‌های عصاره گیاهی (µg/ml)
	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
آبی	۱۰۰	۸۴/۶۲	۷۵	۵۰۰
	۹۲/۹۲	۷۵	۵۹	۲۵۰
	۸۵/۷۲	۵۵/۵۵	۲۵	۱۲۵
	۶۰	۳۰/۷۶	۱۶/۶۸	۶۲/۵
الکلی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۰۰
	۱۰۰	۹۲/۳۱	۷۵	۲۵۰
	۹۰	۷۷/۷۸	۳۷/۵	۱۲۵
	۷۰	۵۵/۵۶	۲۵	۶۲/۵



نمودار شماره ۱. تاثیر غلظت های مختلف عصاره آبی گل همیشه بهار بر لیشمانیا ماژور پس از ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت. (میانگین تعداد پروماستیگوت‌ها در هر چاهک)

www.SID.ir

www.SID.ir



نمودار شماره۲ . تاثیر غلظت مختلف عصاره الکلی گل همیشه بهار بر لیشمانیا ماژور پس از ۲٤، ٤٨ و۷۲ ساعت. (میانگین تعداد پروماستیگوت‌ها در هر چاهک)

بحث و نتیجه‌گیری

لیشمانیوز بیماری وسیع الطیف انگلی است که کم و بیش از سراسر جهان گزارش می‌شود. تاکنون واکسن یا داروی مناسبی برای مهار انگل و نیز روش شیمیایی مناسبی در مبارزه قاطع با ناقل آن ارائه نشده است،(۱۸-۲۱). درمان مناسب لیشمانیوز به گونه ی لیشمانیای آلوده‌کننده و سندرم بالینی آن بستگی دارد،(۲۳-۲۲). داروهای آنتی‌موان پنج ظرفیتی، سدیم استیبوگلوکونات(پنتوستام) و مگلومین آنتی‌موان(گلوکانتیم) از جمله ی درمان های اصلی در چند دهه ی اخیر بوده‌اند و شکست درمانی روزافزونی افزاینده گزارش می گردد،(۲۵-۲۴). دکسی کولات آمفوتریسین B مؤثر اما نسبتاً سمی است،(۲۶). و تاکنون هیچ درمانی کاملاً رضایت بخشی شناخته نشده است. استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری های انگلی به زمان های باستان بر می گردد که از Cinchona succiruba (Rubiaceae) به عنوان داروی ضد مالاریا استفاده شده است،(۲۷). سن و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر لیشمانیاکشی گیاه آرتمیسنین ترایگرس را بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا دونووانی بررسی کردند و مشاهده نمودند که آرتمیسنین دارای اثر ضد لیشمانیایی بر پروماستیگوت ها و آماستیگوت‌ها بود،(۲۸). در مطالعه دیگری یوسفی و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر کشندگی گیاهان پکانوم هارمالا و آلکانا تینکتورا را بر لیشمانیا ماژور در شرایط in vitro انجام دادند و دریافتند که هر دو عصاره دارای اثر مهاری بر پروماستیگوت‌ها بودند،(۲۹). در این مطالعه از عصاره آبی و الکلی گل همیشه بهار استفاده شده که هر دو عصاره اثر مهار کنندگی رشد بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور داشتند ولی تاثیر عصاره الکلی بیشتری بود. بیشترین میزان کشندگی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در هر دو عصاره دیده شد در حالی که کمترین اثر کشندگی مربوط به غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بود و تعداد انگل ها با افزایش زمان و افزایش غلظت در هر دو عصاره کاهش یافت بین تعداد انگل ها در گروه شاهد و گروه مورد اختلاف معنی دار آماری وجود داشت. بررسی متون و نتایج پژوهش کنونی نشان می دهند و این تحقیق که برخی ترکیبات طبیعی دارای اثرات ضد لیشمانیایی می‌باشند که انجام مطالعات بیشتر در زمینه اثر ضد لیشمانیایی گیاهان دارویی را می طلبد و تا بتوان از این ترکیبات در تهیه داروی موثر لیشمانیوز استفاده نمود.

سپاسگزاری

هزینه این طرح از اعتبارات کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است و با تشکر از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نموده اند.

www.SID.ir

References

1-Desjeux P. Leishmaniasis public health and control. Clin Dermatol 1996; 14: 417–23.
2-Vyvyan JR. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. Tetrahedron 2002; 58: 1631 –46.
3-Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavecz M, Della Loggia R, Tubaro A, et al. Anti-edematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (Calendula officinalis L.) J Ethnopharmacol 1997; 57: 139–44.
4-J Kathi MD, MPH Kemper. Calendula (Calendula officinalis). 1999; 1-13.
5-Khodzhaeva MA, Turakhozhaev MT. Carbohydrates of Calendula officinalis. Chemistry of Natural Compounds 1993; 29: 533-4.
6-Bisset NJ. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm, Stuttgart and CRC, Bota Raton, Ann Arbor, London and Tokyo 1994; 566.
7-Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phytochemistry 1996; 43: 1255-60.
8-Patrick KFM, Kumar S, Edwardson PAD, Hutchinson J . Induction of vascularization by an aqueous extract of the flowers of Calendula officinalis L., the European marigold.Phytomedicine 1996; 3: 11-18.
9-Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Antioxidant potential of Calendula officinalis flowers in vitro and in vivo. Pharmaceutical Biol 2006;44(9): 691–7.
10-Kasiram K, Sakharkar PR, Patil AT. Antifungal activity of Calendula officinalis. Indian J Pharm Sci 2000; 6: 464–6.
11-Della Logia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Issac O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of Calendula flowers. Planta Med 1994; 60: 516–20.
12-Dumenil G, Chemli R, Balausard G. Evaluation of antibacterial properties of Calendula officinalis flowers and mother homeopathic tinctures of Calendula officinalis. Ann Pharma Fran 1980;38: 493–9.
13-Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J. Cytotoxic and antitumoral activity of Calendula officinalis extracts. Pharmazie 1988; 43: 220–1.
14-Krag K. Plants used as contraceptives by the North American Indians: an ethnobotanical study. Botanical Museum Cambridge MA; Harvard University 1976: 1177.
15-Montvale NJ, Fleming T. PDR for herbal medicines. Medical Economics Company Inc 1998.
16-Mozherenkov VP, Shubina LF. Treatment of chronic conjunctivitis with Calendula. Med Sestra 1976; 35: 33-4.
17-Vijayasarathy V, sharma L, Prakash A. Indigenous drug treatment for hemorrhoids. Probe 1981; 20: 285-7.
18-Dumonteil E, McMahon-Pratt D, Price VL. Report on the fourth TDR/IDRI meeting on second generation vaccine against leishmaniasis. Merida, Yucatan, Mexico, May 1-3, 2001. Rev Biomed 2002; 13(1): 53-8.
19-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.
20-Reed SG. Leishmaniasis vaccination: targeting the source of infection. J Exp Med 2001; 194(3): 331-42.
21-Wolff JA, Malone RW, Williams P, Ascadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into
mouse muscle in vivo. Science 1990; 247(4949 Pt 1): 1465-8.
22-Pearson RD and Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis 1996; 22: 1-13.
23-Berman JD. Human leishmaniasis: clinical. Diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997; 24: 684-703.
24-Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotrapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am J Trop Med Hyg 1992; 47: 117-26.
25-Herwaldt BL and Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical

www.SID.ir

studies. Am J Trop Med Hyg 1992; 46: 296-306.
26-Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Barat D, Singh RK. Daily versus alternate-day regimen of amphotericin B in the treatment of kala-azar: a randomized comparison. Bull, World Health Org 1994; 72: 931-6.
27-Kayser O, Kiderlen A, Croft SL. Natural products as potential antiparasitic drugs, In: Atta-ur- Rahman (Hg.), Studies in Natural Products Chemistry, Part G: Bioactive Natural Products, Amsterdam: Elsevier Science BV; 2002; 26(12): 779-848.
28-Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani
Promastigotes. Medical Microbiology 2007; 56: 1213–18.
29-Yousefi R, Ghaffarifar F, Dalimi Asl A. The effect of alkanna tincturia and peganum harmala extracts on leishmania major (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Iranian J Parasitol 2009; 4(1): 45-52.(Persian)

***

Evaluation of Leishmanicidal Effect of Watery & Ethanolic Flowers *Calendula officinalis* Extract on Promastigotes of Leishmania Major (MRHO/IR/75/ER) in Vitro

*Maspi N[1], Ghafarifar F[*2],Bahrami AM[3], Bastaminezhad S[1], Shamsi M[4]*

(Received: 11 Aug. 2009 Accepted: 23 Feb. 2010)

Abstract

Introduction: *Calendula officinal* is a member of Asteraceae family. *Calendula officinal* is used for the treatment of skin disorders and pain. It is also applied as a bactericide, antiseptic or anti-inflammatory drug. In this study, the leishmanicidal effect of Calendula officinal with various concentrations was evaluated on promastigotes of L. major in vitro.

Materials & Methods: The dried and ground flowers of the plant were extracted using maceration in 80% ethanol, and then the liquid was dehydrated in an evaporator. Afterwards, different concentrations of the extract (500 µg/ ml, 250 µg /ml, 125 µg/ml and 62.5 µg/ml) were prepared in vitro and 5×104 promaastigotes/well were seeded in a 96-well cell culture plate and was added 100µl of each extract/well. The plate was incubated at 24oC for three days and the number of parasites in each well was determined on 24h, 48h, and 72h of experiment microscopically using Neubauer Chamber. RPMI culture medium was used as one negative control.

Findings: The extract at concentration of 500µg/ml was found to kill all the parasites. Lower doses exhibited a dose-dependent antileishmanial activity. However, the number of L. major promastigotes in the negative control increasingly grew on 24h, 48h, and 72h respectively. IC50 was calculated for ethanolic & watery *Calendula officinalis*; 170µg/ml, 215µg/ml after 24h respectively.

Discussion & Conclusion: These results indicated that extract of *Calendula officinalis* is of favorable leishmanicidal activity and can be a candidate for leishmaniasis treatment.

Key words: leishmania major, *Calendula officinalis*, extract

1. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Science, Ilam, Iran
2. Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (corresponding author)
3. Dept of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran
4. Dept of parasitology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Science, Hamadan, Iran

www.SID.ir