Archive of SID

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۵، مرداد ۱۳۹۵، ۴۳۸-۴۲۵

بررسی ترکیبات و اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی اندام‌های هوایی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* (*MRHO/IR/75/ER*) و یک ایزوله بالینی در شرایط آزمایشگاهی

الهام قریروند اسکندری[۱]، منیر دودی[۲]

دریافت مقاله:۹۴/۱۰/۲۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح:۹۵/۱/۲۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده:۹۵/۳/۹ پذیرش مقاله:۹۵/۳/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز، مشکلات بهداشتی جهانی با اندمیسیته بالا در کشورهای درحال‌توسعه مانند ایران به وجود آورده است. عوارض جانبی داروها، مقاومت دارویی و نبود واکسن مؤثر و مطمئن سبب توجه به ترکیبات جدید مؤثر ازجمله گیاهان دارویی مانند گیاه خرفه شده است. بنابراین، هدف از این مطالعه معرفی یک گیاه طبی سنتی به نام خرفه است که می‌تواند به‌عنوان یک منبع ارزشمند از عوامل دارویی جدید علیه لیشمانیوز جلدی مورد توجه قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه که از نوع آزمایشگاهی است، در بهار سال ۱۳۹۴ و در شهر اصفهان انجام گرفت. ابتدا عصاره متانولی به روش خیساندن آماده و به روش گازکروماتوگرافی جرمی، تعیین ترکیب شد. پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* ابتدا در محیط کشت اشنایدر و سپس در فاز ثابت در محیط کشت RPMI-1640 کشت داده شدند. سپس با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT (متیل‌تیازولیل تترازولیوم)، فعالیت بیولوژیکی عصاره الکلی گیاه خرفه در مقایسه با گلوکانتیم علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* مورد ارزیابی قرار گرفت و داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS16 و با استفاده از آزمون آماری Tukey و آزمون t تجزیه‌وتحلیل شدند. نتایج مطالعه میکروسکوپی نیز به‌صورت عکس و جدول ارائه گردید.

یافته‌ها: IC_{50} برای عصاره الکلی گیاه خرفه علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* استاندارد بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۹۰، ۲۷۰ و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و علیه پروماستیگوت‌های ایزوله بالینی ۱۱۶۰، ۳۸۵ و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. IC_{50} برای گلوکانتیم نیز برابر با ۲۷، ۱۲ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۶، ۱۹ و ۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بین IC50 عصاره و داروی گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). چروکیدگی سلولی، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم و کوچک‌تر شدن در سلول‌های تیمار شده مشاهده گردید. وجود آلکالوئیدها و فلاوونوئیدها در عصاره الکلی تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این‌که عصاره الکلی گیاه مورد آزمون دارای اثرات ضدلیشمانیایی قابل‌توجهی در شرایط آزمایشگاهی بود، لزوم انجام آزمایش‌های بیشتر برای ارزیابی اثر آن روی این انگل در مدل حیوانی نیز احساس می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات ضدلیشمانیایی، لیشمانیوز جلدی، متیل تیازولیل تترازولیوم

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
تلفن: ۳۳۱۲۰۱۳۶-۰۳۱، دورنگار: ۳۳۱۲۰۱۳۶-۰۳۱، پست الکترونیکی: monirdoudi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مردم بسیاری در برخی از کشورها به‌ویژه کشورهای درحال‌توسعه، به لیشمانیوز مبتلا هستند. لیشمانیوز را می‌توان ازلحاظ بالینی به سه دسته لیشمانیوز جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی تقسیم کرد که فرم جلدی آن شایع‌تر بوده و در برخی از کشورها از قبیل ایران به‌وفور یافت می‌شود [۱]. گونه‌های مختلف *لیشمانیا* از طریق گزش پشه *فلبوتوموس پاپاتاسی* (*Phlebotomus papatasi*) و برخی دیگر از گونه‌های *فلبوتوموس* و *لوتزومیا* (*Lutzomyia*) انتقال می‌یابند [۲-۱].

لیشمانیوز جلدی در ایران ازنظر بالینی به دو شکل روستایی و شهری مشاهده شده است. لیشمانیوز جلدی روستایی بیماری مشترک انسان و حیوان بوده و لیشمانیوز جلدی شهری به انسان‌دوست معروف است. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی *لیشمانیا ماژور* و عامل لیشمانیوز جلدی شهری *لیشمانیا تروپیکا* است. در اغلب مناطق ایران نوع روستایی غالب است. لیشمانیوز جلدی، بعد از مالاریا، از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در ایران به شمار می‌رود [۳].

تاکنون واکسن مؤثر و مطمئنی برای این بیماری ساخته نشده است و مبارزه با این بیماری همواره در برنامه‌ریزی‌های ملی کشور ما موردتوجه بوده و علی‌رغم سرمایه‌گذاری‌های ملی و بین‌المللی نه تنها این بیماری ریشه‌کن نشده است بلکه همواره با نمایان شدن کانون‌های جدید بیماری در گوشه و کنار کشور شیوع بیشتری پیدا می‌کند [۳].

همچنین، در سال‌های اخیر به دلیل ظهور مقاومت علیه داروهای استاندارد که عمدتاً ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان می‌باشند، درمان لیشمانیوز با دشواری‌های فراوانی مواجه شده است. گزارش‌های پزشکان معالج حاکی از عود، عدم بهبود و یا تأثیر نامناسب این داروها در بیماران است و از طرف دیگر، این درمان‌ها به‌ویژه در مناطق روستایی به خاطر هزینه سنگین و عدم دسترسی به آن مناسب نیست [۴].

تحقیقات اخیر بر ترکیبات طبیعی گیاهی، اثرات ضدلیشمانیایی کینولین، آلکالوئیدها، ایزوکینولین آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، نفتوکینون‌ها و ترپن‌ها را در برخی از گونه‌های *لیشمانیا* نشان داده است [۱]. گیاهانی که دارای فلاونوئید، آلکالوئید و ترپنوئید هستند، خاصیت ضدالتهابی دارند [۵].

ازجمله داروهای ضدلیشمانیایی که منشأ گیاهی دارد، می‌توان به آرتمیزینین اشاره کرد. آرتمیزینین یک ترپن لاکتون جداشده از گیاه درمنه (*Artemisia annua*) است که به‌عنوان داروی ضدمالاریا و ضدلیشمانیا شناخته شده است [۶].

Taran و همکاران اثربخشی صمغ بنه (*Pistacia atlantica*) را به‌صورت موضعی در درمان لیشمانیوز پوستی در مدل حیوانی (موش Balb/c) بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد صمغ این درخت می‌تواند برای کنترل لیشمانیوز جلدی روستایی استفاده و مانع پیشرفت زخم سالک گردد [۷].

Sawadogo و همکاران با استفاده از روش‌های کلریمتری و اسپکتروفتومتری به این نتیجه رسیدند که

www.SID.ir

Archive of SID

عصاره لانتانا (*Lantana ukambensis*) فعالیت ضدلیشمانیایی با IC50 برابر با ۹/۶ دارد [۸].

Ogeto و همکاران فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره‌های گیاه آلوئه (*Aloe secundiflora*) را علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. IC50 برای عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب برابر با ۲۷۹/۴۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴۲/۸۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۹].

Yousefi و همکاران، اثرات گیاه زعفران (*Crocus sativa*) و فعالیت آپوپتوتیک آن را علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. IC50 گیاه زعفران بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون برابر با ۰/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود [۱۰].

Gharirvand eskandari و همکاران طی انجام پژوهشی اثر ضدلیشمانیایی گیاه یونجه سیاه (*Medicago lupulina*) را بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* (*MRHO/IR/75/ER*) ، به روش MTT مورد بررسی قرار داده و اعلام کردند که IC50 برای عصاره الکلی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برابر با ۱۶۵، ۹۸ و ۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۱۱].

مواد مؤثره گیاه خرفه شامل اگزالیک‌اسید، کینامیک‌اسید، کافئیک‌اسید، مالئیک‌اسید، اسیدسیتریک، کومارین‌ها، فلاوونوئیدها، آلانین، تانن، آلفالینولئیک‌اسید، ساپونین، استروئید، فنول، ماده صمغ‌مانند، ماده لزج‌مانند، روغن، چربی و گلیکوزوئیدهای منوتروپینی است و مشخص شده که آلکالوئیدها ازجمله مهم‌ترین مواد شیمیایی این گیاه است. خرفه منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین A, B_1, B_2, C, E و بتاکاروتن و سایر اسیدآمینه‌های ضروری است [۱۲].

تحقیقات تعدادی از محققین نشان داده است که مولکول‌های فعال موجود در خرفه برای درمان عفونت‌های انگلی مانند تریپانوزومیازیس مورد استفاده قرار گرفته است [۱۳].

عصاره الکلی اندام‌های هوایی خرفه شامل ساقه و برگ در درمان زخم در موش آزمایشگاهی [۱۴] و درمان استوماتیت (التهاب دهانی) در بیماران داوطلب استفاده شده و مؤثر بوده است [۱۵].

اخیراً نیز فلاوونوئیدی به نام اپی‌ژنین از این گیاه استخراج شده است. بررسی‌ها نشان داده است که اپی‌ژنین دارای ویژگی‌های ضدتوموری است [۱۲،۱۶].

Dhole و همکاران، تأثیر ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی برگ و ریشه این گیاه را بر باکتری‌های گرم‌مثبت (*باسیلوس سابتیلیس* و *استافیلوکوکوس آرئوس*) و گرم‌منفی (*سودوموناس آئروژینوزا*) و قارچ *آسپرژیلوس نایژر* به اثبات رساندند. در این آزمون از روش آگار دیفیوژن استفاده شده بود. عصاره‌های اتانولی و آبی ریشه این گیاه در غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هاله‌های عدم رشدی با قطر زیاد تشکیل داده بودند [۱۲].

Nayaka و همکاران، آزمونی انجام دادند و تأثیر ضدمیکروبی عصاره کلروفرمی این گیاه را به روش آگار دیفیوژن بر باکتری‌هایی نظیر *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *باسیلوس سرئوس* و قارچ‌های *آسپرژیلوس نایژر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *نوروسپورا کراسا* به اثبات رساندند [۱۶].

www.SID.ir

Archive of SID

در این پژوهش اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی اندام‌های هوایی گیاه خرفه، شامل ساقه و برگ، بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* (*MRHO/IR/75/ER*) و یک ایزوله بالینی این انگل به روش MTT و میکروسکوپی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

به دلیل خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدزخم گیاه خرفه، این گیاه انتخاب شد تا در صورت داشتن خاصیت ضدلیشمانیایی، علاوه بر فعالیت ضدانگلی علیه *لیشمانیا ماژور* برای ترمیم زخم سالک نیز مورد استفاده قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه که به‌صورت آزمایشگاهی در بهار سال ۱۳۹۴ و در مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری صدیقه طاهره شهر اصفهان به انجام رسیده است، اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی برگ‌ها و ساقه گیاه خرفه را بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* (*MRHO/IR/75/ER*) و یک ایزوله بالینی انگل به روش MTT، مورد بررسی و ارزیابی قرار داده است.

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) با کد هرباریومی ۱۵۱/۰۰۱/۰۰۱ در فصل بهار از زمین‌های زراعی اطراف اهواز واقع در استان خوزستان شناسایی و جمع‌آوری گردید.

برگ‌ها و ساقه‌ها در شرایط استریل و زیر هود (JAHL، ایران) از این گیاه جدا و جمع‌آوری گردید و با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس زیر سایه، در دمای معمولی اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد) و تحت تأثیر باد پنکه خشک گردید [۱۲] و عصاره الکلی آن مطابق روش خیساندن (ماسراسیون) با استفاده از ۵۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد (مجللی، ایران) به دست آمد. عصاره به‌دست‌آمده، دارای غلظت ۵ گرم در ۵۰ سی‌سی حلال یا ۲/۵ گرم در ۱۰۰ سی‌سی حلال بود (۰/۰۲۵ gr/cc). عصاره‌ها تا زمان استفاده در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند [۱۱].

مقدار ۱۰ سی‌سی از عصاره الکلی جهت انجام گازکروماتوگرافی جرمی مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش برای تعیین ترکیبات موجود در عصاره الکلی، از دستگاه GC/MS (Aglient ، آمریکا) شامل ردیاب جرمی Aglient 5975 C با منبع یونیزاسیون الکترونی (EI) کوپل‌شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Aglient 7890 دارای ستون HP-5MS با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد.

دمای محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی روی ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، دمای منبع یونیزاسیون ردیاب جرمی روی ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آنالایزر (کوادروپل) روی ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای واسط بین MS و GC روی ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

سویه استاندارد انگل *لیشمانیا ماژور* (*MRHO/IR/75/ER*) از آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان تهیه گردید.

در آزمایشگاه مقدار کمی از آن به یک فلاسک حاوی ۳ سی‌سی محیط کشت اشنایدر (Biosera، انگلستان)، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (SIGMA، آمریکا) و ۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

میکرولیتر از استوک پن- استرپ (گروه صنایع شفا فارمد، ایران) منتقل شد و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محیط کشت اشنایدر نقش محیط کمکی را ایفا می‌کند و شرایط فیزیولوژیک حیات را برای انگل فراهم می‌آورد [۱۱].

برای تهیه نمونه بالینی نیز با کسب اجازه از یک خانم میان‌سال مبتلا به زخم سالک، محل ضایعه با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شد و برش کوچکی در حاشیه برجسته زخم به‌وسیله تیغ جراحی یکبار مصرف ایجاد گردید. مقداری از بافت همراه با سروزیته از موضع ضایعه برداشته و روی لام، گسترش تهیه شد. اسمیرهای تهیه‌شده روی لام‌ها در مقابل هوا خشک و با متانول (مجللی، ایران) در چند دقیقه فیکس گردید و با گیمسا (SIGMA، آمریکا) به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. لام‌ها زیر میکروسکوپ نوری (Nikon، ژاپن) با لنز ۴۰x بررسی اولیه شده و سپس با لنز روغنی ۱۰۰x جهت مشاهده اشکال آماستیگوت انگل، آزمایش شد [۱۷].

آزمایش مستقیم ازنظر آماستیگوت مثبت بود. به‌این‌ترتیب با استفاده از اسکالپل از حاشیه برجسته زخم، نمونه گرفته شد و به سرم فیزیولوژی انتقال پیدا کرد و چند ساعت بعد نمونه‌های بالینی به محیط کشت N.N.N (HIMEDIA، هندوستان) که دوفازی است، منتقل شد. البته برای اطمینان از رشد کامل نمونه‌ها، قسمتی از محیط کشت N.N.N و سرم فیزیولوژی به محیط کشت اشنایدر حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی منتقل شد [۱۷].

ابتدا به مدت ۳ روز انگل‌های *لیشمانیا ماژور* (سویه استاندارد و ایزوله بالینی) در محیط کشت اشنایدر داخل فلاسک نگه داشته شد و سپس از آن لام تهیه شد تا میزان رشد انگل مشاهده گردد. به این منظور با پیپت پاستور استریل یک قطره از محیط کشت اشنایدر برداشته و روی لام گذاشته و به‌آرامی لامل روی آن قرار داده شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری در نور کم پروماستیگوت‌های متحرک مشاهده گردید، اما تعدادشان بسیار کم بود. مشاهده پروماستیگوت‌ها حاکی از این مطلب است که انگل در حال رشد می‌باشد [۱۶].

ازآنجایی‌که اگر انگل به مدت طولانی در محیط کشت بماند، تولید توکسین می‌کند و مواد غذایی نیز رو به کاهش می‌رود، لذا به فلاسک دیگری حاوی ۳ سی‌سی محیط کشت اشنایدر، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۵ میکرولیتر از استوک پن-استرپ، انتقال داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بعد از ۳ روز دوباره لام گرفته شد و پروماستیگوت‌های متحرک مشاهده گردیدند. آن‌قدر پاساژ دادن و لام گرفتن هر ۳ روز یکبار، ادامه پیدا کرد تا بالاخره اجسام روزت مشاهده شدند. جسم روزت شامل چند پروماستیگوت است که از ناحیه تاژک به یکدیگر گره‌خورده‌اند. وجود روزت در زیر میکروسکوپ، به ما اعلام می‌دارد که انگل به فاز لگاریتمی رسیده است. بعدازاین، به‌منظور کشت انبوه، پروماستیگوت‌ها باید به محیط کشت RPMI-1640 (HIMEDIA، هندوستان) انتقال یابند [۱۷].

عصاره الکلی خشک‌شده در دمای معمولی، با استفاده از آب مقطر استریل و دی‌متیل‌سولفوکساید (سیناژن، ایران)

www.SID.ir

Archive of SID

رقیق‌سازی شد. از دی‌متیل‌سولفوکساید به‌عنوان امولسیفایر استفاده شد. سپس برای بررسی تأثیر عصاره الکلی بر انگل، با استفاده از محیط RPMI-1640 به روش سری رقت، رقت‌های ۱۶۰۰، ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده گردید. بیشترین رقتی که می‌شد تهیه کرد، ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

داروی گلوکانتیم (SIGMA، آمریکا) یکی از بهترین داروهای رفرنس جهت از بین بردن این انگل است که ابتدا مقدار لازم از آن در بافر فسفات (PBS) (SIGMA، آمریکا) حل گردید، سپس با استفاده از محیط RPMI-1640 در اپندورف‌های مربوطه به روش تهیه سریال رقت، این دارو رقیق‌سازی شد. ۵ رقت ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و سپس رقت‌های عصاره الکلی و گلوکانتیم از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا استریل شوند [۱۱].

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی انگل به‌صورت دو میلیون انگل در میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد، سپس ۴۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره و داروی گلوکانتیم به چاهک‌های مربوط به تست (محیط کشت واجد انگل) و محیط کشت فاقد انگل به‌صورت سه‌گانه اضافه شد و درنهایت کمی تکان داده شد و سطح پلیت با پارافیلم بسته شد و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۴-۳۳ درجه سانتی‌گراد اینکوبه (Abzar medical Kavosh، ایران) گردید [۱۱،۱۸]. سپس ۳۰ میکرولیتر معرف MTT (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (SIGMA، آمریکا) به هر چاهک حاوی پروماستیگوت انگل اضافه شد. زمان اینکوباسیون ۴ ساعت بود که بعد از اتمام ۱ ساعت سلول‌ها به کمک میکروسکوپ نوری و اینورت (Olympus، ژاپن) بررسی شد تا بلورهای فورمازان را که در سلول‌ها تشکیل شده و غشای آن را پاره کرده است، در زیر میکروسکوپ مشاهده شود. سپس محیط و محلول MTT به کمک پی‌پت پاستور و پوآر به‌آرامی کشیده شد، به‌طوری‌که بلورهای فورمازان از کف ظرف جدا نشوند. پس از ۴ ساعت اینکوباسیون در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل‌سولفوکساید برای حل کردن کریستال‌های فورمازان اضافه شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک اینکوبه شد. جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر (DRG، آمریکا) در طول موج ۶۳۰ -۵۴۰ نانومتر بررسی شد [۱۸،۱۹].

سپس با ورود مقادیر جذب نوری چاهک‌ها و فرمول شماره ۱ به نرم‌افزار SPSS16، درصد پروماستیگوت‌های زنده *لیشمانیا ماژور* بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید و بر اساس درصد پروماستیگوت‌های زنده و غلظت‌های مورداستفاده از گلوکانتیم و عصاره، نموداری رسم شد و با استفاده از نمودار، مقدار IC50 تعیین گردید و داده‌ها با استفاده از تست Tukey و آزمون t مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند [۱۸].

$$\text{Viable Cells Percent} = [(AT - AB) / (AC - AB)] \times 100$$

فرمول ۱- محاسبه پروماستیگوت‌های تیمار شده با گلوکانتیم یا عصاره گیاهی

درنهایت نیز اثر گلوکانتیم و عصاره الکلی خرفه بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* سویه استاندارد و نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

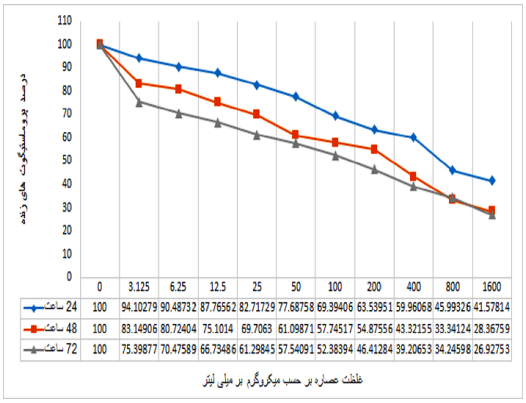
بالینی ازلحاظ مرفولوژی مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت و تعداد پروماستیگوت‌های تغییرشکل‌یافته پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش گردید.

جهت ارزیابی تغییرات مرفولوژی پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* (*MRHO/IR/75/ER*) و سویه بالینی ابتدا سلول‌های پروماستیگوت این انگل به کمک دستگاه سانتریفیوژ (Eppendorf، آلمان) در دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شده و ماده رویی به‌آرامی جدا گردید و باقی‌مانده آن در محلول PBS معلق شد. تغییرات مرفولوژی انگل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۱۰۰x مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت [۲۰].

نتایج

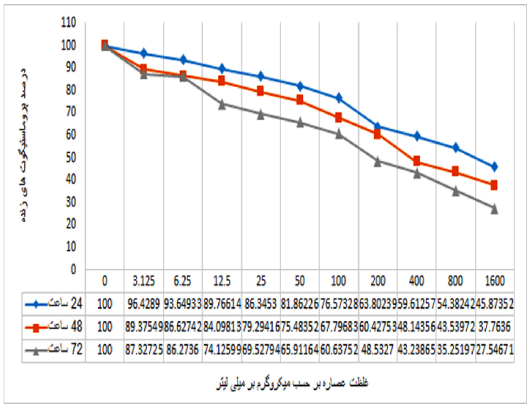
نتایج بررسی اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی خرفه در ۱۰ غلظت مختلف (۱۶۰۰، ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* استاندارد و بالینی تحت شرایط *in vitro* به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودارهای ۱ و ۲ ارائه شده است.

با توجه به نمودارهای ۱ و ۲، IC_{50} برای عصاره الکلی اندام‌های هوایی خرفه علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* استاندارد و نمونه بالینی در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۹۰، ۲۷۰ و ۱۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۱۶۰، ۳۸۵ و ۱۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.



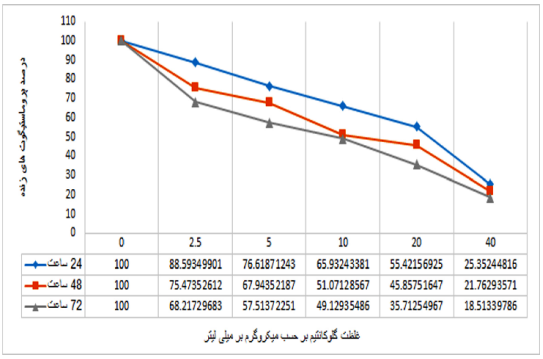
	0	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600
24 ساعت	100	94.10279	90.48732	87.76562	82.71729	77.68758	69.39406	63.53951	59.96068	45.99326	41.57814
48 ساعت	100	83.14906	80.72404	75.1014	69.7063	61.09871	57.74517	54.87556	43.32155	33.34124	28.36759
72 ساعت	100	75.39877	70.47589	66.73486	61.29845	57.54091	52.38394	46.41284	39.20653	34.24598	26.92753

نمودار ۱- محاسبه IC_{50} عصاره الکلی ساقه و برگ خرفه با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده از اثر غلظت‌های مختلف آن بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سویه استاندارد تحت شرایط in vitro به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



	0	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600
24 ساعت	100	96.4289	93.64933	89.76614	86.3453	81.86226	76.57328	63.80239	59.61257	54.38242	45.87352
48 ساعت	100	89.37549	86.62742	84.09813	79.29416	75.48352	67.79683	60.42753	48.14356	43.53972	37.7636
72 ساعت	100	87.32725	86.2736	74.12599	69.52794	65.91164	60.63752	48.5327	43.23865	35.25197	27.54671

نمودار ۲- محاسبه IC_{50} عصاره الکلی ساقه و برگ خرفه با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده از اثر غلظت‌های مختلف آن بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سویه بالینی تحت شرایط in vitro به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

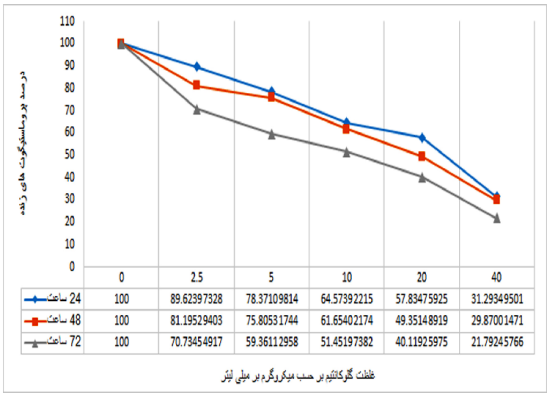


	0	2.5	5	10	20	40
24 ساعت	100	88.59349901	76.61871243	65.93243381	55.42156925	25.35244816
48 ساعت	100	75.47352612	67.94352187	51.07128567	45.85751647	21.76293571
72 ساعت	100	68.21729683	57.51372251	49.12935486	35.71254967	18.51339786

نمودار ۳- محاسبه IC_{50} داروی گلوکانتیم، به‌عنوان گروه کنترل، بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد در محیط in vitro به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

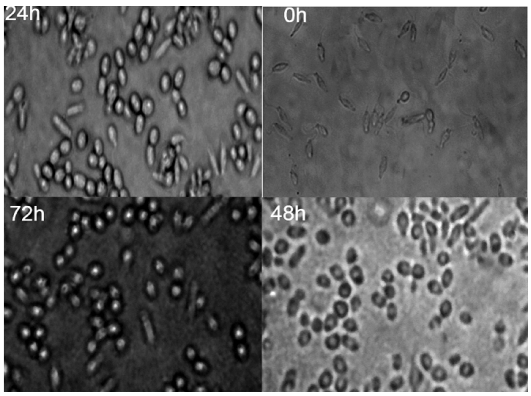
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ٤- محاسبه IC50 داروی گلوکانتیم، به‌عنوان گروه کنترل، بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور نمونه بالینی در محیط in vitro به روش MTT بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت

طبق نمودارهای ۳ و ۴، مقادیر IC50 برای داروی گلوکانتیم علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* استاندارد و نمونه بالینی در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۲۷، ۱۲ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۶، ۱۹ و ۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.



شکل ۱- مرفولوژی انگل لیشمانیا ماژور استاندارد تیمارشده با عصاره الکلی گیاه خرفه در ساعات ٢٤، ٤٨ و ٧٢ در بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. گرد شدن، چروکیدگی و کوچک شدن سلول‌ها در تصویر مشهود است. برای ایزوله بالینی انگل نیز همین وضعیت وجود داشت.

تغییرات سلولی در پروماستیگوت‌های تیمارشده با عصاره الکلی، شامل چروکیدگی سلولی، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم و کوچک‌تر شدن سلول‌ها بود (مطابق با شکل ۲).

جدول ۱- بررسی مرفولوژی و پرولیفراسیون پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور تحت تأثیر عصاره الکلی ساقه و برگ خرفه

مدت‌زمان برحسب ساعت / درصد پروماستیگوت‌های تغییرشکل‌داده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
درصد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* استاندارد تغییرشکل‌داده تحت تأثیر ۲۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی ساقه و برگ گیاه خرفه	٪۳۶	٪۶۰	٪۸۲
درصد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* بالینی تغییرشکل‌داده تحت تأثیر ۳۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی ساقه و برگ گیاه خرفه	٪۲۷	٪۵۶	٪۶۹

با توجه به جدول ۱، درصد پروماستیگوت‌های تغییرشکل‌داده در پروماستیگوت‌های سویه استاندارد انگل *لیشمانیا ماژور* بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۳۶٪، ۶۰٪ و ۸۲٪ بود. همچنین در مورد پروماستیگوت‌های ایزوله بالینی انگل، این اعداد معادل ۲۷٪، ۵۶٪ و ۶۹٪ بود. بعد از مدت‌زمان‌های مذکور، کل سلول‌های مشاهده و درصدها محاسبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- اجزای تشکیل‌دهنده عصاره الکلی ساقه و برگ خرفه پس از GC/MS

ماده	مقدار (٪)
فیتول (Phytol)	٪ ۹/۵۴
اسکوآلن (Squalene)	٪ ۸/۹۱
پالمیتیک‌اسید (Palmitic acid)	٪ ۷/۰۶
اتیل‌لینولئات (Ethyl linoleate)	٪ ۶/۰۴
فرولیک‌اسید (Ferulic acid)	٪ ۳/۱
لینولنیک‌اسید (Linolenic acid)	٪ ۰/۷۲
اسکوپولتین (Scopoletin)	٪ ۸/۷۰
لینولئیک‌اسید (Linoleic acid)	٪ ۷/۶۶
رئین (Rhein)	٪ ۵/۲۳
اپی‌ژنین (Apigenin)	٪ ۵/۰۸
برگاپتن (Bergapten)	٪ ۲/۷۱

بحث

با توجه به گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی مبنی بر اینکه لیشمانیوز از خطرناک‌ترین بیماری‌های عفونی است و این که داروهای شیمیایی مربوط به این بیماری دارای عوارض جانبی زیادی می‌باشد، اخیراً گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۱].

بررسی و شناخت گیاهان دارویی مورداستفاده در طب سنتی و ترکیبات تشکیل‌دهنده آنها می‌تواند سبب دستیابی به منابع دارویی مؤثرتر، ارزان‌تر، کم‌عارضه‌تر و دارای منشاء گیاهی شود [۱].

در حال حاضر از روش‌هایی برای بررسی داروها و ترکیب‌های ضدلیشمانیایی استفاده می‌شود که محدودیت‌های زیادی دارند؛ برای مثال خطرناک هستند، نیاز به پیش‌سازهای رادیواکتیو دارند و این که بسیار سخت و زمان‌بر هستند [۱۸،۲۲].

در مطالعه‌ای اثربخشی ماده مترشحه از برگ‌های *آلوئه ورا* روی لیشمانیوز بررسی و IC50 عصاره این گیاه از ۱۰۰ تا ۱۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد [۲۲].

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های انگلی به زمان‌های باستان برمی‌گردد که از روبیاسهآ (*Cinchona succirruba*) به‌عنوان داروی ضدمالاریا استفاده شده است [۱].

یک گروه تحقیقاتی تأثیر ضدلیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی، آنغوزه و غوزه پنبه و داروی کنترل تارتارامتیک را بر روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* به روش MTT در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. IC50 برای همه عصاره‌ها محاسبه و مؤثر بودن آنها ثابت گردید [۲۳].

در بررسی‌هایی که در حیطه تأثیر ضدلیشمانیایی داروهای شیمیایی و ترکیبات گیاهی در ایران و سایر کشورها انجام گرفته است، مشاهده می‌شود که اغلب از روش شمارش مستقیم به‌وسیله لام هموسایتومتر بهره

www.SID.ir

Archive of SID

گرفته شده است که روشی زمان‌بر و غیرمناسب است [۲۴،۲۵].

روش‌های رنگ‌سنجی که برای بررسی رشد و زنده بودن سلول بر پلیت‌های میکروتیتر انجام می‌گیرند، فواید زیادی ازجمله آسان، ارزان، سریع، حساس و دقیق بودن را دارند. به‌علاوه، این روش‌ها فاقد مواد رادیواکتیو هستند و قابلیت تکرار دارند [۲۶،۲۸].

در این آزمون، برای تعیین غلظتی از عصاره الکلی اندام‌های هوایی خرفه که در آن حدود ۵۰ درصد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* کشته شوند (IC50)، با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT غلظت‌های مختلفی از عصاره موردنظر مورد آزمایش قرار گرفت. میانگین جذب نوری کمتر، نشان‌دهنده تأثیر بیشتر عصاره بود.

در این پژوهش نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره الکلی و گلوکانتیم، اثر مهاری بر روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* افزایش می‌یافت و کاهش جذب نوری نشان‌دهنده این اثر مهاری بود. مقایسه میانگین جذب نوری عصاره الکلی ساقه و برگ خرفه با داروی کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌داد ($P<0/05$) که دال بر تأثیر عصاره الکلی ساقه و برگ خرفه در غلظت‌های مختلف بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* بود.

سلول‌های انگل *لیشمانیا ماژور* استاندارد در مواجهه با غلظتی از گلوکانتیم و عصاره الکلی ساقه و برگ خرفه که به‌عنوان IC50 بعد از ۴۸ ساعت شناخته شده بود، قرار گرفتند و در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شدند که تغییراتی در آنها حاصل شده بود. این تغییرات پس از مواجهه با گلوکانتیم و عصاره الکلی آغاز شد و شامل چروکیدگی سلولی، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم و کوچک‌تر شدن سلول‌ها بود و هیچ‌گونه تغییری در سلول‌های کنترل مشاهده نشد.

فرم پروماستیگوت انگل را اغلب در محیط‌های کشت N.N.N و RPMI-1640 کشت می‌دهند. محیط کشتی که در این تحقیق علاوه بر محیط کشت N.N.N مورد استفاده قرار گرفت، محیط کشت اشنایدر بود [۲۴-۱۴، ۱۱-۳]. کشت در محیط اشنایدر معمولاً در عرض ۷-۲ روز و در محیط N.N.N تا ۲۱ روز طول می‌کشد تا ارگانیسم رشد کند [۱].

همچنین برآورد فیتوشیمیایی عصاره الکلی اندام‌های هوایی خرفه نشان داده بود که دارای فلاونوئید، آلکالوئید، فنول، تانین و دی‌ترپن‌ها می‌باشد [۱۲،۱۳]. در این پژوهش نیز وجود موادی نظیر اپی‌ژنین، فیتول، اسکوآلن، رئین و برگاپتن تأیید گردید.

بررسی نتایج این پژوهش و پژوهش‌های مشابه، نشان می‌دهد که برخی ترکیبات طبیعی دارای اثرات ضدلیشمانیایی می‌باشند که انجام مطالعات بیشتر در زمینه اثر ضدلیشمانیایی گیاهان دارویی را می‌طلبد تا بتوان از این ترکیبات در تهیه داروهای مؤثر ضدلیشمانیوز استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

در این پروژه اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی ساقه و برگ گیاه خرفه در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که دارای اثرات ضدلیشمانیایی قابل‌توجهی است. باوجوداینکه اختلاف معناداری بین IC50 عصاره الکلی گیاه و داروی گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸

www.SID.ir

Archive of SID

و ۷۲ ساعت مشاهده گردید، اما با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی، می‌توان این دسته از گیاهان دارویی بومی را مورد توجه قرار داد و پس از تأیید مؤثر بودن آنها علیه انگل لیشمانیا در محیط آزمایشگاه، اثر ضدلیشمانیایی آنها را در مدل‌های حیوانی و انسان‌های داوطلب بررسی و ارزیابی نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی بیماری‌های عفونی و گرمسیری صدیقه طاهره اصفهان جهت فراهم آوردن محیط آزمایشگاهی، مسئول محترم هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان جهت تعیین گونه گیاه و کادر محترم آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان جهت تأمین سوش‌های انگل و کلیه عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری رسانده‌اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آوریم.

References

[1] Mohseni N, Sajjadi S.E, Eskandarian A.A, Yousefi H.A, Mansurian M, Shokoohinia Y, et al. Natural Anti-Leishmaniasis Compounds in Traditional Iranian Medicine. *JITM* 2012; 3(1): 41-50. [Farsi]

[2] Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *J Travel Med infect Dis* 2004; 5(3):150-8.

[3] Ramezani Y, Mousavi GA, Bahrami A, Fereydooni M, Parsa N, Kazemi B. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Aran and Bidgol city from April to September 2009. *KAUMS* 2011; 15: 254-8. [Farsi]

[4] BabaeeKhoo L, Mohebali M, Nikan L, MehrabiTavana A. The therapeutic effect of eucalyptus, Myrtus, ferula, aretmisia, Allium and Urtica extracts against cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania major* in smal white mice. *Hakim research j* 2007; 10(2): 21-7. [Farsi]

[5] Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep* 2001; 18(6): 674-88.

[6] Beigi boroujeni M, Arjmand M, Khalili G, Akbari Z, Najafi A, Beigi boroujeni N, et al. The metabonomic changes of leishmania major, s promastigotes (fredlin strain) after in vitro artemisinin treatment at stationary phase. *koomesh* 2014; 16 (1): 90-6. [Farsi]

[7] Taran M, Mohebali M, Esmaeli J. In Vivo Efficacy of Gum Obtained Pistacia atlantica in Experimental Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Iran J Public Health* 2010; 39(1): 36-41.

[8] Sawadogo WR, Le douaron G, Maciuk A, Bories C, Loiseau PM, Figadère B, et al. In vitro

www.SID.ir

Archive of SID

antileishmanial and antitrypanosomal activities of medicinal plants From Burkina Faso. *Parasitol Res* 2012; 110(5): 1779-83.

[9] Ogeto T.K, Odhiambo R.A, Shivairo R.S, Muleke C.I, Osero B.O, Anjili C, Ingonga J.M, et al. Antileishmanial activity of *Aloe secandiflora* plant extracts against *Leishmnia major*. *Adv Life Sci Tech* 2013; 13: 9-18.

[10] Yousefi E, Eskandari A, Gharavi MJ, Khademvatan Sh. In vitro activity and cytotoxicity of Crocus sativus extract against leihmania major (MRHO/IR/75/ER). *Infect Disord Drug Targets* 2014; 14(1): 56-60. [Farsi]

[11] Gharirvand Eskandari E, Doudi M, Abedi S. The study of antileishmanial effect of Medicago lupulina leaves alcoholic extract on Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) by MTT assay. *IRJABS* 2016; 10(1): 59-65. [Farsi]

[12] Dhole JA, Dhole NA, Lone KD, Bodke SS. Preliminary phytochemical analysis and antimicrobial activity of some weeds collected from marathwada region. *J of Researchin Biology* 2011; 1: 19-23.

[13] Dkhil MA, Abdel Moniem AE, Al Quraishy S, Awadallah SR. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and it mechanism of action. *J of Medicin Plants Research* 2011; 5(9): 1563-89.

[14] Rafiee-Vardanjani L, Sahinfard N, Rahimi-Madiseh M, Ansari-Samani R, Rahimi M, Parvin N, et all. Effect of Portulaca oleracea L vice versa silver sulfadiazine on burn wound healing in Balb/c mice. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2012; 13(6): 92-100. [Farsi]

[15] Najafi S, Mohammadzadeh M, Meighani G. The effect of Purslane in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *TUMJ* 2013; 71(2): 102-8. [Farsi]

[16] Nayaka HB, Londonkar RL, Umesh MK, Tukappa A. Antibacterial attributes of apigenin, isolated from *Portulaca oleracea L. Hindawi Publishing Corporation International J of Bacteriol* 2014; Article ID 175851: 8.

[17] Khademvatan SH, Gharavi MJ, Rahim FMilteFosine induced apoptotic cell death on *Leishmania major* and *L.Tropica* strains. *Korean J Parasitol* 2011; 49(1): 17–23. [Farsi]

[18] Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int* 2000; 48(3): 265-9.

[19] Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A. et al. Development of a semiautomated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *J Microbiol Methods* 2006; 66(1): 79-86.

[20] Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(8): 3010-5.

www.SID.ir

Archive of SID

[21] WHO. Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. *Geneva* 2010; 949: 22-6.

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

[23] Barati M, Sharifi I, Sharififar F. In vitro Evaluation of Anti-Leishmanial Activities of *Zataria multiflora Boiss*, *Peganum harmala* and *Myrtus communis* by Colorimetric Assay. *J Kerman Uni Med Sci* 2010; 17(1):32-41. [Farsi]

[24] Lamidi M, Digiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C. *In vitro* products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12(6): 514-35.

[25] Jafari MR, Behravan J, Bodagh Abadi A, Ramezani M. Evaluation of leishmanicidal effect of *Euphorbia myrsinites* extract by in vitro antileishmanial assay using promastigote of *Leishmania major*. *Iran J Basic Med Sci* 2006; 4(8): 295-8. [Farsi]

[26] 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* promastigots. *Parasitol Res* 1994; 80(3): 235-9.

[27] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrasolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2): 271-7.

www.SID.ir

Archive of SID

The Study of Composition and Anti-leishmanial Effect of *Portulaca Oleracea* Aerial Organs Hydroalcoholic Extract on Leishmania Major (Mrho/Ir/75/Er) and A Clinical Isolate In Vitro

E. Gharirvand Eskandari[1], M. Doudi[2]

Received:16/01/2016 Sent for Revision:17/04/2016 Received Revised Manuscript:29/05/2016 Accepted:11/06/2016

Background and Objectives: Leishmaniasis has created global health problems in the developing countries with high endemicity such as Iran. Drug side effects and resistance and the lack of effective and safe vaccine have caused the new effective compounds from medicinal plants such as purslane to be attended. Therefore, the aim of this study was to introduce purslane as a traditional medicinal plant, which can be taken into consideration as a valuable source of new pharmaceutical agents against cutaneous leishmaniasis.

Material and Methods: This is a laboratory study conducted in Isfahan in the spring of 2015. In the first place, the methanol extract was prepared by soaking method and its combination was determined by mass chromatography gas method. *L. major* promastigotes were cultured in Schneider culture media and in the stationary phase in RPMI-1640 medium, respectively. Then, using colorimetric MTT (methyl thiazolyl tetrazolium), the biological activity of alcoholic extract of purslane against *L. major* promastigotes was assessed in comparison to meglumine. The data were analyzed by the Tukey test and t-test using software SPSS16. Microscopic study results were presented as images and tables.

Resalts: IC50 for alcoholic extract of purslane against standard *L. major* promastigotes after 24, 48 and 72 hours were 690, 270 and 140 micrograms per mililiter and against clinical isolates of promastigotes of 1160, 385 and 140 micrograms per milliliter, respectively. IC50 for Glucantime equaled to 27, 12 and 8 micrograms per ml and 26, 19 and 11 micrograms per milliliter, respectively. There was a significant difference between the IC50 extract and glucantime drug after 24, 48 and 72 hours ($p<0.05$). There was observed cell shrinkage, roundness, compressed cytoplasm and smallness in the treated cells. Presence of alkaloids and flavonoids were detected in the alcoholic extract.

Conclusion: In regard to alcoholic extract of purslane had considerable anti-leishmanial effect in vitro, conducting more experiments to investigate its effect on the parasite in animal model also seems to be necessary.

Key words: Antileishmanial compounds, Cutaneous Leishmaniasis, Methyl Tiasolyl Tetrasolium

Funding: The authors and Isfahan Seddigheh Tahereh Research Laboratory of Infectious and Tropical Diseases

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The ethics Committee of Isfahan Seddigheh Tahereh Research Laboratory of Infectious and Tropical Diseases

How to cite this article: Gharirvand Eskandari E, Doudi M. The Study of Composition and Antileishmanial Effect of *Portulaca Oleracea* Aerial Organs Hydroalcoholic Extract on Leishmania Major (Mrho/Ir/75/Er) and a Clinical Isolate in Vitro. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2016; 15(5):425-38. [Farsi]

1- MSc in Microbiology, Dept. of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
(Corresponding Author) Tel: (031) 33120136, Fax: (031) 33120136, Email: monirdoudi@yahoo.com

www.SID.ir