

بررسی اثر ضدلیشمانيایی عصاره الکلی و اسانس برگ‌های گیاه دارویی یونجه سیاه، بومی منطقه فریدن اصفهان، بر تعدادی از سوش‌های بالینی پرماستیگوت‌های انگل لیشمانيا مازور در شرایط آزمایشگاهی

الهام قریروند اسکندری^۱، منیر دودی^{۲*}

چکیده

مقدمه: لیشمانيوز، مشکلات بهداشتی جهانی فراوانی به وجود آورده است. عوارض جانبی داروها، مقاومت دارویی و نبود واکسن مؤثر و مطمئن سبب توجه به ترکیبات جدید مؤثر گیاهی شده است. بنابراین هدف از این مطالعه معرفی یک گیاه طبی سنتی به نام یونجه سیاه (*Medicago Lupulina*) می باشد که می تواند به عنوان یک منبع ارزشمند دارویی علیه لیشمانيوز جلدی مورد توجه قرار بگیرد.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی، عصاره الکلی به روش ماسراسیون و اسانس به روش تقطیر با آب آماده گردید.

پرماستیگوت‌های لیشمانيا مازور (*Leishmania major*) در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد ابتدا در محیط کشت N.N.N و سپس در محیط اشنايدر و بالاخره در محیط RPMI-1640 کشت داده شدند. سپس با استفاده از روش MTT (Methyl Thiazole Tetrazolium) مقدار IC50 (Inhibitory Concentrations 50%) برای عصاره، اسانس و گلوکانتیم تعیین گردید. نتایج با استفاده از آزمون آماری Tukey و t تجزیه و تحلیل شد و به وسیله نرم افزار SPSS16 ارائه گردید. تست MTT برای هر نمونه، ۳ بار تکرار شد.

نتایج: IC50 برای عصاره و اسانس برگ‌های یونجه سیاه و گلوکانتیم علیه پرماستیگوت‌های لیشمانيا مازور بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۹، ۱۳۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۹۰، ۳۴۰، ۸۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲۶، ۱۹ و ۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. بین IC50 عصاره و اسانس گیاهی و گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی و اسانس گیاه مورد آزمون دارای اثرات ضدلیشمانيایی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی بودند. به این ترتیب می‌توانند در زمرة گیاهان طبی ضد لیشمانيوز مورد توجه قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانيوز، لیشمانيا مازور، گلوکانتیم، یونجه سیاه، MTT

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۱۲۳۰۴۳۳، پست الکترونیکی: monirdoudi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۸

مقدمه

عنوان داروهای انتخابی اول مصرف می‌شوند اما طی چند سال اخیر اثربخشی این داروها به میزان ۵۰-۲۰ درصد کاهش یافته است و در حال حاضر ظهور فرم‌های مقاوم یکی از معضلات اصلی درمان به شمار می‌رود. پیدایش سویه‌های مقاوم منجر به معرفی عوامل ضدلیشمانیایی جدید نظیر میلتوفسین، آمفوتريسین B، کتوکونازول، پارومومایسین و سایر ترکیبات شیمیایی شده است که در عین حال هیچ کدام از این داروها بدون اثرات جانبی نیستند. همچنین سمیت این عوامل و پایداری اثرات جانبی آنها، حتی بعد از اصلاح میزان دوز و درمان طولانی مدت، از جمله نقایص آنها است. از طرفی این درمان‌ها به ویژه در مناطق روسایی به خاطر هزینه سنگین و عدم دسترسی به آن مناسب نیست.^(۳)

تحقیقات اخیر در زمینه ترکیبات طبیعی گیاهی، اثرات ضدلیشمانیایی کینولین، آلالکالوئیدها(مانند: کوپسارین)، ایزوکینولین آلالکالوئیدها(مانند: لیماسین)، فلاونوئیدها(مانند: لوთئولین)، ساپونین‌ها(مانند: آلفا-هدرین)، نفتوكینون‌ها(مانند: لایپاچول) و ترپن‌ها را در برخی از گونه‌های لیشمانیا نشان داده است(محسنی و همکاران، ۱۳۹۱). گیاهانی که دارای فلاونوئید، آلالکالوئید و ترپنوئید هستند، خاصیت ضد التهابی دارند.^(۴,۵).

در پژوهشی فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره گیاه سداب کوهی را بر رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مازور در مقایسه با یک داروی سه ظرفیتی آنتیموان به نام پتاسیم آنتیمونیل تارتارات با استفاده از روش MTT در شرایط آزمایشگاهی، مورد بررسی قرار داده بودند. هم عصاره و هم داروی آنتیموان بعد از ۷۲ ساعت رشد انگل را در محیط کشت مهار کرده بودند. در واقع قدرت هر دو عامل در مهار رشد، تقریباً با هم برابر بود به طوری که با افزایش غلظت، قدرت آن‌ها بیشتر هم می‌شد. IC₅₀ برای عصاره مساوی با ۱۸۳۲/۶۵±۸۹/۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای داروی آنتیموانی مساوی با ۱۷/۸۷±۲/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در نتیجه، با توجه به عوارض داروهای آنتیموانی می‌توان از

لیشمانیوز جلدی از زمان‌های دور در ایران وجود داشته و امروزه کشور ما یکی از کانون‌های مهم این بیماری در جهان محسوب می‌شود.^(۱)

لیشمانیوز جلدی در ایران از نظر بالینی به دو شکل روستایی(زخم مرطوب) و شهری(زخم خشک) مشاهده شده است. لیشمانیوز جلدی روستایی بیماری مشترک انسان و حیوان ZCL (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis) بوده و به نام ACL (Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis) نام دارد. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی لیشمانیا مازور و عامل لیشمانیوز جلدی شهری لیشمانیا تropیکا(Leishmania tropica) هست. لازم به ذکر است که در اغلب مناطق ایران نوع ZCL غالب است. آمار ثبت شده مبتلایان به فرم جلدی در کشور ما سالانه حدود ۲۰ هزار نفر است و عده‌ای معتقدند که ارقام واقعی بین ۵-۴ برابر این تعداد بوده و بعد از مalaria از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در ایران به شمار می‌رود.^(۱)

ناکارآمد بودن روش‌های کنترل مخازن و ناقل، هزینه‌های درمانی، عوارض ناشی از درمان به کمک ترکیبات آنتیموانی، طولانی بودن دوره درمان‌های موجود و پاسخ نگرفتن از آن‌ها، جست و جو برای یافتن روشی مؤثر علیه لیشمانیوز را توجیه می‌کند.^(۲)

مطالعات متعدد نشان داده است که لیشمانیوز پوستی در ایران و جهان رو به افزایش است. همچنین در سال‌های اخیر به دلیل ظهور مقاومت علیه داروهای استاندارد که عمدهاً ترکیبات پنج ظرفیت آنتیموان می‌باشند، درمان لیشمانیوز با دشواری‌های فراوانی مواجه شده است. گزارش‌های پزشکان معالج حاکی از عود، عدم بمبود و یا تأثیر نامناسب داروها در بیماران است، به طوری که مطالعه لامیدی و همکاران روی بیمارانی که به آمریکای لاتین برگشته بودند، نشان داد که با وجود مراقبت ویژه و درمان با سدیم استیبوگلوکانات میزان عود بیماری حداقل ۲۵ درصد است. در بیشتر نقاط جهان مکلومین آنتیمونات(گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکانات(پنتوستام) به

داروی ضد مalaria و ضد لیشمانیا شناخته شده است. این دارو در شرایط آزمایشگاهی با تغییر در متabolیت‌های مربوط به چرخه‌های متabolیسمی مختلف از جمله مسیر متabolیسمی گالاكتوز، مسیر بیوسنتر اسفنگولپید و همچنین مسیر بیوسنتر والین، لوسین و ایزولوسین منجر به توقف فعالیت انگل لیشمانیا مژبور سویه فردلین گردیده است.^(۱۰).

بالوچ(Baloch) و همکاران در آزمونی تأثیرات ضد میکروبی، حشره‌کشی، ضد توموری و برآورد فیتوشیمیایی عصاره متانولیک و فراکسیون‌های آن را از برگ‌های گیاه یونجه سیاه، مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها از روش آگار دیفیوژن استفاده کردند. برای این هدف آزمون‌های مختلف بیولوژیکی برای عصاره متانولی و فراکسیون آن که شامل فراکسیون کلروفرم، فراکسیون -n- بوتانول و -n- هگزان، فراکسیون اتیل استات، فراکسیون -n- بوتانول و فراکسیون آبی بود، انجام شدند. فعالیت ضد باکتریایی بر ضد استافیلوکوکوس آرئوس(*Staphylococcus aureus*) با روش چاهک پلیت با قطر هاله‌ای برابر با(میلی‌متر $29/0.2 \pm 0.18$) در حالی که فراکسیون کلروفرم فعالیت قوی‌تری را نشان داده بود و قطر هاله‌ای برابر با (میلی‌متر $26/0.2 \pm 0.04$) در برابر همین باکتری از خود نشان داد. عصاره متانولی علیه قارچ‌های کاندیدا آلبیکانس(*Candida albicans*) و کاندیدا گلابراتا(*Candida glabrata*) فعالیت ضد قارچی با قطر هاله‌ای برابر با(میلی‌متر $36/0.2 \pm 0.02$) و (میلی‌متر $42/16 \pm 0.09$) از خود نشان داد. فراکسیون کلروفرم فعالیت خوبی علیه کاندیدا گلابراتا با قطر هاله‌ای برابر با(میلی‌متر $32/0.3 \pm 0.09$) از خود نشان داد. عصاره متانولی فعالیت کشنده‌گی قوی ضد حشره‌ای علیه حشره تربیولیم کاستانئوم(*Tribolium castaneum*) به میزان ۸۶ درصد و علیه حشره ریزوپرتا دومینیکا(*Rhyzopertha dominica*) به میزان ۷۵ درصد از خود نشان داد. فراکسیون کلروفرم فعالیت کشنده‌گی قوی عالی علیه حشره تربیولیوم کاستانئوم به میزان ۷۰ درصد از خود نشان داد. عصاره متانولیک این گیاه فعالیت فوق العاده ضد توموری به میزان $89/40$ درصد از خود نشان داد. به علاوه برآورد فیتوشیمیایی عصاره‌ها

عصاره این گیاه به عنوان عاملی علیه لیشمانیا مژبور در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود.^(۶)

در مطالعه‌ای به دنبال ارزیابی اثر کشنده‌گی عصاره الکلی و آبی گل همیشه بهار بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژبور(MRHO/IR/75/ER) در شرایط آزمایشگاهی، اعلام داشتند که عصاره‌های مژبور در غلظت 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر تمام انگل‌ها را کشته و غلظت‌های کمتر، فعالیت ضدلیشمانیایی وابسته به دوز نشان دادند که IC_{50} پس از 24 ساعت در عصاره الکلی و آبی به ترتیب 170 میکروگرم بر میلی‌لیتر و 215 میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.^(۷)

براتی و همکاران، تأثیر ضدلیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی قوزه پنبه(*Ferula assa- foetida L.*، آنفوذه) و *Gossypium hirsutum* را بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژبور به روش MTT در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و نتایج به صورت IC_{50} برای هر کدام از عصاره‌ها به صورت جداگانه محاسبه شد. عصاره‌های درمنه کوهی، آنفوذه و قوزه پنبه به ترتیب IC_{50} $5/9$ ، $5/5$ و $3/6$ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان IC_{50} تارتارامتیک برابر با $4/7$ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. اگر چه عصاره قوزه پنبه نسبت به دو عصاره دیگر تأثیر بیشتری روی پروماستیگوت‌ها نشان داد، ولی کلاً همه این عصاره‌ها دارای فعالیت ضد لیشمانیایی بودند.^(۸)

اوگتو(Ogeto) و همکاران فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره‌های گیاه آلوئه سکاندی فلورا(*Aloe secundiflora*) را علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژبور در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. از میان عصاره‌های این گیاه، عصاره آبی و متانولیک بالاترین تأثیر ممانعت‌کننده از رشد را برای پروماستیگوت‌ها داشتند. IC_{50} برای عصاره‌های آبی و متانولیک به ترتیب برابر با $279/488$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و $42/825$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.^(۹)

از جمله داروهای ضدلیشمانیایی که منشأ دارویی دارد، می‌توان به آرتیمیزینین اشاره کرد. آرتیمیزینین یک ترپن لاتکتون جدا شده از گیاه درمنه آنوا(*Artemisia annua*) است که به عنوان

برگ‌ها 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. عصاره الکلی آن مطابق روش خیساندن(ماسراسیون) با استفاده از ۵۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد(مجللی، ایران) و اسانس به روش تقطیر با آب به دست آمد(۸).

جهت تهیه عصاره الکلی، گیاه خرد شده در ظرفی که از جنس شیشه بود، وارد و مقدار ۵۰ سی‌سی از اتانول ۸۰ درصد روی آن ریخته شد. برای این که از تغییرات شیمیایی در اثر فعل و انفعالات بیوشیمیایی حاصل از نور خورشید در امان باشد، در محیطی دور از نور خورشید مراحل کار انجام گرفت و همچنین برای جلوگیری از تبخیر حلال، درب ظرف عصاره‌گیری محکم بسته شد. عصاره‌ها به مدت ۵ روز روی شیکر قرار گرفتند، هدف از این کار ایجاد تعادل غلظت در مواد موجود در حلال و بافت گیاهی بود. در نهایت عصاره حاصله را به کمک فیلتر سر سرنگی صاف نموده و باقیمانده گیاهی با دستگاه پرس تحت فشار قرار گرفت. در خاتمه عصاره‌ها با هم مخلوط و جهت ته نشین شدن رسوبات و کدورت حاصل، ۵ روز در حرارت کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری نموده و سپس با احتیاط از تبخیر شدن حلال، صاف گردید. عصاره به دست آمده، دارای غلظت ۵ گرم در ۵۰ سی‌سی حلال یا ۲/۵ گرم در ۱۰۰ سی‌سی حلال بود. عصاره‌ها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند(۱۲).

برای هر بار اسانس‌گیری نیز مقدار ۱۰۰ گرم از پودر خشک گیاه مورد نظر، توسط دستگاه کلونجر(پیرکس فن، ایران) به روش تقطیر با آب به مدت ۲ ساعت اسانس‌گیری شد. مقدار ۳۰۰ گرم از پودر خشک گیاه برداشته شد، سپس سه بار اسانس‌گیری انجام شد. در پایان هر اسانس‌گیری، اسانس به صورت یک لایه مجزا روی آب تشکیل گردید. در نهایت اسانس‌ها به شیشه‌های استریل کوچک که با فویل آلومینیومی پوشانده شده بودند منتقل شد تا از نور آفتاب در امان باشد.

نشان داد که این گیاه دارای فلاونوئید، آلالکالوئید، فنول، تانین و دی ترپن‌ها است(۱۱).

در این پژوهش اثر ضدیشمانیایی عصاره الکلی و اسانس برگ‌های گیاه یونجه سیاه بر پروماستیگوت‌های یک ایزوله بالینی انگل لیشمانیا ماذور به روش MTT مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

به دلیل خواص ضدبacterیایی، ضدقارچی، ضد توموری، ضد حشره‌ای و ضدزخم گیاه یونجه سیاه، این گیاه انتخاب شد تا در صورت داشتن خاصیت ضدیشمانیایی، علاوه بر فعالیت ضدائگلی علیه لیشمانیا ماذور برای ترمیم زخم سالک نیز مورد استفاده قرار بگیرد.



شکل ۱: تصویر تهیه شده از نمونه‌ای از گیاه یونجه سیاه جمع‌آوری شده برای این پژوهش

روش بررسی

این مطالعه که به صورت آزمایشگاهی در بهار سال ۱۳۹۴ و در مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرم‌سیری صدیقه طاهره شهر اصفهان به انجام رسیده است، اثر ضدیشمانیایی عصاره الکلی و اسانس برگ‌های گیاه یونجه سیاه را بر پروماستیگوت‌های ایزوله بالینی انگل لیشمانیا ماذور به روش MTT، مورد بررسی و ارزیابی قرار داده است.

گیاه یونجه سیاه از زمان‌های قدیم توسط مردم منطقه فریدن اصفهان، برای درمان زخم‌های پوستی مورد استفاده قرار می‌گرفته است و در این زمینه دارای شهرت فراوانی است.

گیاه یونجه سیاه (*Medicago lupulina*) با کد هرباریومی ۱۰۰۹/۰۰۹۰۰۷۳ در فصل بهار از مراتع شهرستان فریدن واقع در استان اصفهان شناسایی و جمع‌آوری گردید.

رنگ‌آمیزی شد. لامها زیر میکروسکوپ نوری (Nikon، ژاپن) با لنز $\times 40$ مورد بررسی اولیه و سپس با لنز روغنی $\times 100$ جهت مشاهده اشکال آماتیگوت انگل، آزمایش شد. آزمایش مستقیم از نظر آماتیگوت مثبت بود(۱۳).

با توجه به چهار عالم منطقه جغرافیایی، لام مستقیم که تراکم جسم لیشمن کمتر از تراکم جسم لیشمن تروپیکا PCR است، شکل زخم که مرطوب و چرک دار بود و PCR (کیازن، ایران) نمونه و بررسی ژن ITS1 (مطابق جدول‌های ۱، ۲، ۳)، نتیجه‌گیری شد که ایزوله بالینی، لیشمانیا ماژور است(۱۴).

اسانس‌ها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند(۱۱).

برای تهیه نمونه بالینی با کسب اجازه از یک خانم میان‌سال مبتلا به زخم سالک، محل ضایعه با اتانول ۷۰ درصد(مجللی، ایران) ضد عفونی و برش کوچکی در حاشیه برجسته زخم به وسیله تیغ جراحی یک بار مصرف ایجاد گردید. مقداری از بافت همراه با سروزیته از موضع ضایعه برداشته و روی لام، گسترش تهیه شد. اسمیرهای تهیه شده روی لامها در مقابل هوا خشک و با متابول(مجللی، ایران) چند دقیقه فیکس گردید و با گیمسا(کارن اطلس پژوه، ایران) به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه

جدول ۱: دستورالعمل بهینه‌شده برای انجام PCR

ردیف	مواد	غلظت اولیه	غلظت نهایی	حجم
۱	بافر PCR	10x	1x	2.5 μ L
۲	MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75 μ L
۳	dNTPmixed	10 mM	0.2 mM	0.5 μ L
۴	پرایمرها (F+R)	100 Pmol/ μ L	10 Pmol/ μ L	2.5 μ L
۵	Template DNA	-	100 ng	1(1-5) μ L
۶	Taq بلیمراز	5 U/ml	1.2 U/ml	0.2 μ L
۷	آب مقطر استریل	-	-	Up to 25 μ L
	حجم کل	-	-	25 μ L

جدول ۲: سیکل حرارتی استفاده شده برای PCR

مواد	دما	زمان	سیکل
Initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
	95°C	20 sec	Denaturation
Annealing	50°C	30 sec	30 cycle
	72°C	1 min	Extention
Post extention	72°C	6 min	1 cycle

جدول ۳: توالی پرایمرهای رفت و برگشت جهت PCR

Primer	Name	Sequence (5' → 3')	Length
Forward	LITSr	CTGGATCATTTCGATG	18
Reverse	L5.8s	TGATACCACTTATCGCACTT	20

منتقل شد. البته برای اطمینان از رشد کامل نمونه‌ها، قسمتی از محیط کشت N.N.N و سرم فیزیولوژی به یک فلاسک حاوی ۳ سی‌سی محیط کشت اشنایدر (Biosera، انگلستان)، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۵ میکرو لیتر از استوک

به این ترتیب با استفاده از اسکالپل از حاشیه برجسته زخم، نمونه گرفته شد و به سرم فیزیولوژی (SIGMA، آمریکا) انتقال پیدا کرد و چند ساعت بعد نمونه‌های بالینی به محیط کشت N.N.N (Himedia، هندوستان) که دو فازی است،

عصاره، انسانس و داروی گلوکانتیم به چاهک‌های مربوط به تست(محیط کشت واجد انگل) و محیط کشت فاقد انگل به صورت سه گانه اضافه شد و در نهایت کمی تکان داده شد و سطح پلیت با پارافیلم بسته شد و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۳-۳۴ درجه سانتی گراد اینکوبه گردید. سپس ۳۰ میکرولیتر معرف MTT (۵/۰ میلی گرم بر میلی لیتر) (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 پی پت پاستور و پوآر به آرامی کشیده شد طوری که بلورهای فورمازان از کف ظرف جدا نشوند. پس از ۴ ساعت اینکوباسیون در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO برای حل کردن کریستال‌های فورمازان اضافه شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک اینکوبه شد. سپس جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر (DRG، آمریکا) در طول موج ۶۳۰-۵۴۰ نانومتر بررسی شد(۱۵).

سپس با ارائه جذب نوری چاهک‌ها و فرمول شماره ۱ به نرمافزار SPSS16، درصد پروماستیگوت‌های زنده لیشمانيا مازور بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید و بر اساس درصد پروماستیگوت‌های زنده و غلظت‌های مورد استفاده از گلوکانتیم، عصاره و انسانس نموداری رسم شد و با استفاده از نمودار، مقدار IC₅₀ تعیین گردید و داده‌ها با استفاده از تست Tukey و آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند(۱۶).

IC₅₀ غلظتی از عصاره است که از رشد ۵۰ درصد پروماستیگوت‌های انگل جلوگیری به عمل می‌آورد(۷).

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

فرمول ۱: محاسبه پروماستیگوت‌های تیمار شده با گلوکانتیم یا انسانس و عصاره گیاهی

پن- استرپ(شفا فارمد، ایران) منتقل شد و در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محیط کشت اشنایدر نقش محیط کمکی را ایفا می‌کند و شرایط فیزیولوژیک حیات را برای انگل فراهم می‌آورد(۱۳).

سپس از آن لام تهیه شد تا میزان رشد انگل مشاهده گردد. با استفاده از میکروسکوپ نوری در نور کم پروماستیگوت‌های متحرک مشاهده گردید. پاساژهای متعدد انجام گرفت تا بالاخره اجسام روزت مشاهده شدند. وجود روزت در زیر میکروسکوپ، به ما اعلام می‌دارد که انگل به فاز لگاریتمی رشد رسیده است. بعد از این به منظور کشت انبوه، پروماستیگوت‌ها باید به محیط کشت (RPMI-1640، هندستان) انتقال یابند(۱۴).

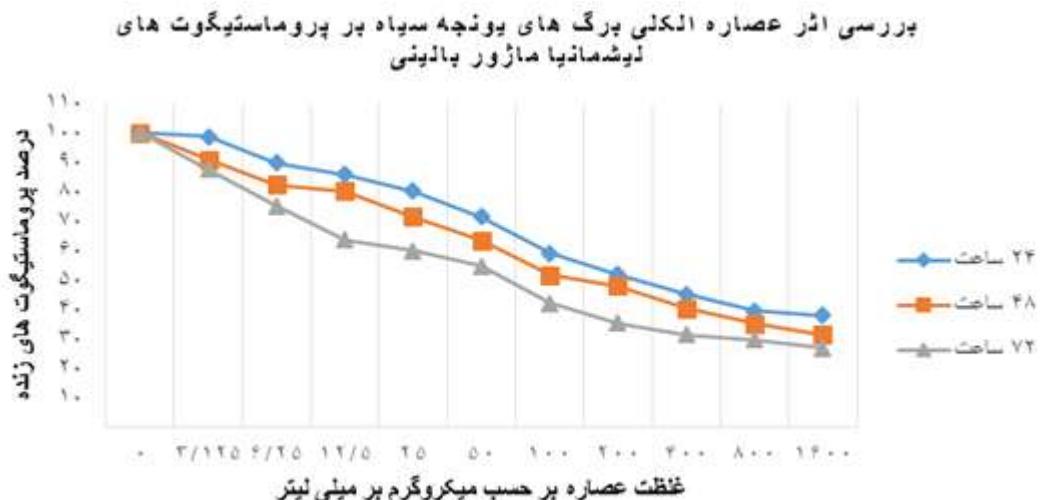
عصاره الكلی خشک شده در دمای معمولی، با استفاده از ۲ سی سی آب مقطر استریل و ۱۰۰ میکرولیتر (Dimethyl sulfoxide) (سیناژن، ایران) رقیق‌سازی شد. برای DMSO خشک کردن انسانس فقط از DMSO استفاده شد. از RPMI-1640 به روش سری رقت، رقت‌های ۱۶۰۰، ۱۴۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۶۰۰، ۱۴۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر آماده گردید. بیشترین رقتی که می‌شد تهیه کرد، ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود(۱۱).

داروی گلوکانتیم (SIGMA، آمریکا) یکی از بهترین داروهای رفرانس جهت از بین بردن این انگل می‌باشد که ابتدا PBS: Phosphate (balanced saline، SIGMA) حل گردید، سپس با استفاده از محیط RPMI-1640 در اپندوروفهای مربوطه به روش تهیه سریال رقت، این دارو رقیق‌سازی شد. ۵ رقت ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و سپس رقت‌های عصاره الكلی و گلوکانتیم از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا استریل شوند(۱۴).

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی انگل به صورت دو میلیون انگل در میلی لیتر به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد، سپس ۴۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف

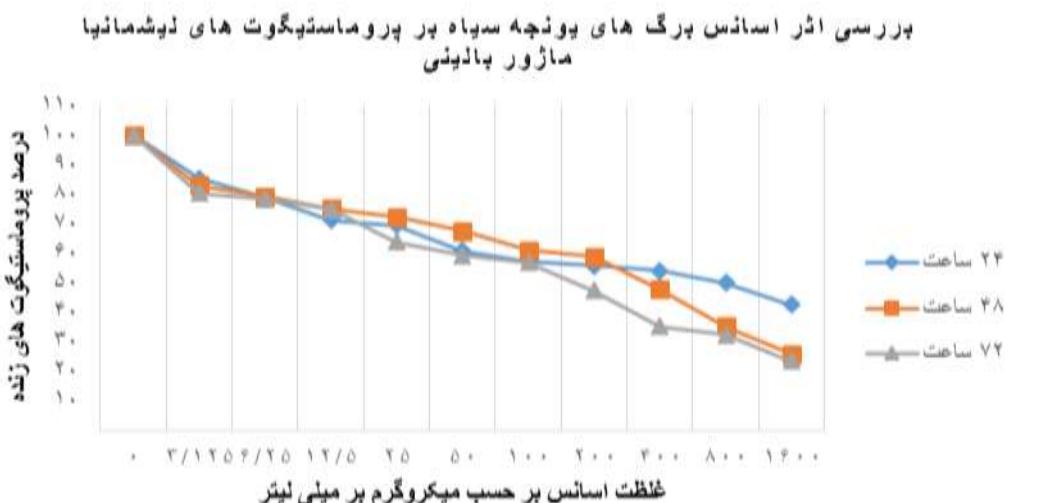
نتایج

نتایج بررسی اثر ضد لیشمانيایی عصاره الکلی و اسانس یونجه سیاه در ۱۰ غلظت مختلف (۱۶۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر)



نمودار ۱: محاسبه IC_{50} عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه با استفاده از نتایج به دست آمده حاصل از اثر غلظت‌های مختلف آن بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور(سویه بالینی) تحت شرایط In vitro بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت(نمودار آبی رنگ: ۲۴ ساعت، نمودار قرمز رنگ: ۴۸ ساعت، نمودار خاکستری رنگ: ۷۲ ساعت).

با توجه به نمودار ۱، IC_{50} برای عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور بالینی در ۱۳۰ و ۶۹ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.



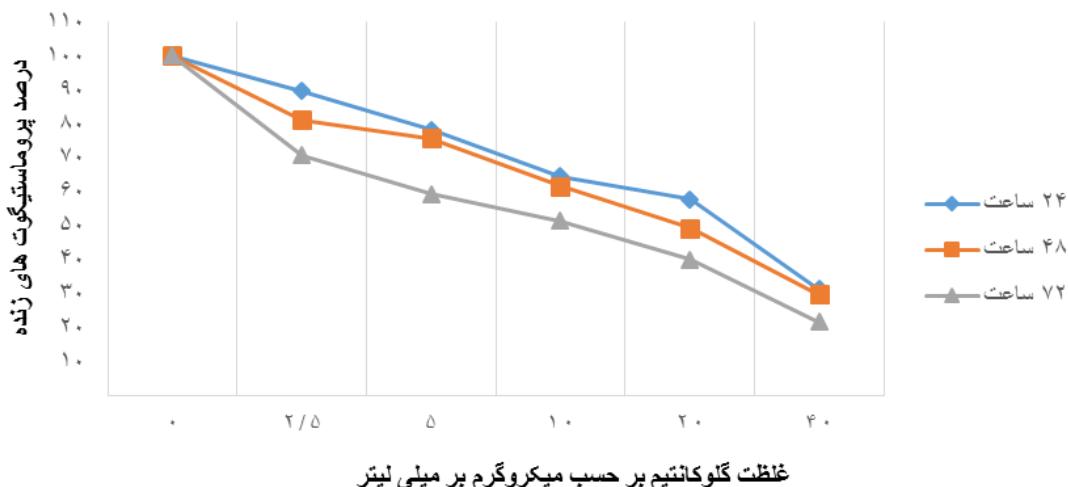
نمودار ۲: محاسبه IC_{50} اسانس برگ‌های یونجه سیاه با استفاده از نتایج به دست آمده حاصل از اثر غلظت‌های مختلف آن بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور (سویه بالینی) تحت شرایط In vitro بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (نمودار آبی رنگ: ۲۴ ساعت، نمودار قرمز رنگ: ۴۸ ساعت، نمودار خاکستری رنگ: ۷۲ ساعت).

اثربخشی عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور(سویه بالینی) تحت شرایط In vitro، به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد که نتایج در نمودار ۲ ارائه شده است:

با توجه به نمودار ۲، IC_{50} برای اسانس برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور(سویه بالینی) در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱، ۳۴۰ و ۱۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

از داروی گلوکانتیم نیز به عنوان گروه کنترل جهت مقایسه

پرسی اثر گذوکانتیم بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور بالینی



غذشت گلوکانتیم بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

نمودار ۳: محاسبه IC_{50} داروی گلوکانتیم، به عنوان گروه کنترل بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور(سویه بالینی) در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (نمودار آبی رنگ: ۴۸ ساعت، نمودار قرمز رنگ: ۷۲ ساعت).

و غیر مناسب است(۱۵).

روش‌های رنگ سنجی که برای برسی رشد و زندگی بودن سلول بر پلیت‌های میکروتیتر انجام می‌گیرند، فواید زیادی از جمله آسان بودن، ارزان بودن، سریع، حساس و دقیق بودن را دارا می‌باشند. این روش‌ها قادر مواد رادیواکتیو هستند و قابلیت تکرار دارند(۱۶).

از میان انبوه مطالعاتی که تاکنون در این زمینه صورت گرفته، می‌توان به دو مورد از آن‌ها اشاره کرد که در آن‌ها اعلام شده که IC_{50} به روش MTT برای عصاره‌های الکلی آویشن شیرازی و اسپند به ترتیب ۴/۷ و ۲/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است(۷).

در مطالعه‌ای اثربخشی ماده مترشحه از برگ‌های آلوئه ورا روی لیشمانیوز برسی و IC_{50} عصاره این گیاه از ۱۰۰ تا ۱۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد(۱۷).

در این تحقیق نیز از میان گیاهانی که دارای مواد مؤثره گیاهی مانند آلکالوئیدها و فلاونوئیدها هستند و همچنین خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد حشره‌ای و ضد توموری

طبق نمودار ۲، IC_{50} برای داروی گلوکانتیم علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور(سویه بالینی) در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۱۹، ۲۹ و ۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

بحث

با توجه به گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی مبنی بر این که لیشمانیوز از خط‌نناک‌ترین بیماری‌های عفونی است و این که داروهای شیمیایی مربوط به این بیماری دارای عوارض جانبی زیادی است، اخیراً گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند(۴).

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های انگلی به زمان‌های باستان بر می‌گردد که از روپیاسه آ Cinchona (succiruba) به عنوان داروی ضدمالاریا استفاده شده است(۶).

در برسی‌هایی 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 به وسیله لام هموسایتومتر بهره گرفته شده است که روشی زمان بر

یونجه سیاه علیه فرم آماتستیگوت انگل لیشممانیا مژور و زخک سالک مورد بررسی قرار نگرفت و این دو مورد از کاستی‌های مهم این پژوهش به حساب می‌آیند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهه اثر ضد لیشممانیایی عصاره الکلی و اسانس برگ‌های یونجه سیاه در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که دارای اثرات ضد لیشممانیایی می‌باشند. با این حال ضرورت انجام آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی آن‌ها بر روی انگل لیشممانیا در مدل‌های حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود که این خود بزرگ‌ترین محدودیت این مطالعه است چرا که فرم اصلی بیماری‌زایی انگل، فرم داخل سلولی (آماتستیگوت) است و برای این که عصاره الکلی و اسانس برگ‌های یونجه سیاه را به عنوان یک ماده ضد لیشممانیایی بدانیم، نیاز است این مطالعات صورت بگیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی بیماری‌های عفونی و گرم‌سیری صدیقه طاهره اصفهان، مسئول محترم هریاریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و کادر محترم آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان و کلیه عزیزانی که در جهت انجام این تحقیق باری رسانده‌اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

هستند، گیاه یونجه سیاه انتخاب شد و تأثیر عصاره الکلی و اسانس برگ‌های آن را بر رشد پروماستیگوت‌های لیشممانیا مژور (سویه بالینی) مطالعه و بررسی گردید.

IC_{50} برای عصاره و اسانس برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشممانیا مژور در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۳۰، ۲۴۰ و ۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۳۴۰، ۸۰۱ و ۱۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین برای داروی گلوکانتیم به ترتیب برابر با ۲۶، ۱۹ و ۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

بین IC_{50} عصاره و اسانس گیاهی و داروی گلوکانتیم بعد از ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری وجود داشت ($p < 0.05$). اما عوارض بالینی داروهای شیمیایی، اهمیت کم این اختلاف را توجیه می‌کند.

همچنین وجه تمایز این پژوهش با سایر مقالات، در این است که برای ایجاد شرایط فیزیولوژیک مناسب جهت رشد انگل، از محیط کشت اشنایدر استفاده شده است. در این محیط کشت، انگل تقریباً بعد از یک هفته وارد فاز لگاریتمی رشد می‌شود و به تعداد زیاد تکثیر می‌یابد، در حالی که اگر فقط در محیط کشت N.N.N باقی بماند، این زمان به حدود یک ماه افزایش پیدا می‌کند.

در این پژوهش تأثیر عصاره الکلی و اسانس برگ‌های گیاه

References:

- 1- 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*. J of Kashan Univ Med Sci 2011; 15(3): 254-58. [Persian]
- 2- Sawadogo WR, Le douaron G, Maciuk A, Bories C, Loiseau PM, Figadere B, et al. *In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of medicinal plants From Burkina Faso*. Parasitolo Res 2012; 110(5): 1779-83.
- 3- Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. *Plant natural products with leishmanicidal activity*. Natural Product Reports 2001; 18(6): 674-88.
- 3- Bhogireddy N, Naga VKA, Ramesh B, Pradeep KM, Reddy OVS, Gaddagutti V, et al. *Anti inflammatory and anti-diabetic activities with their other ethnomedicinal properties of the plants*. J Medicinal Plant Studies 2013; 1(5): 87-96.

- 4- Mohseni N, Sajjadi SE, Eskandarian AA, Yousefi HA, Mansurian M, Shokoohinia Y, et al. *Natural Anti-Leishmaniasis Compounds in Traditional Iranian Medicine*. J Islamic Iranian Traditional Med 2012; 3(1): 41-50. [Persian]
- 5- Mirzaie M. *Antileishmanial of Peganum harmala Extract on the In vitro Growth of Leishmania major Promastigotes in Comparison to a Trivalent Antimony Drug*. Veterinarski Arhiv 2007; 77(3): 365-75. [Persian]
- 6- Maspi N, Ghafarifar F, Bahrami AM, Bastaminezhad S, Shamsi M. *Evaluation of Leishmanicidal Effect of Watery & Ethanolic Flowers Calendula officinalis Extract on Promastigotes of Leishmania Major (MRHO/IR/75/ER) in Vitro*. Sci J of Ilam Univ Med Sci 2010; 18(1): 28-33. [Persian]
- 7- 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 Univ Med Sci 2010; 17(1): 32-41. [Persian]
- 8- Ogetto TK, Odhiambo RA, Shivairo RS, Muleke CI, Osero BO, Anjili C, et al. *Antileishmanial activity of Aloe secundiflora plant extracts against Leishmnia major*". Advances in Life Sci Techno 2013; 13: 2224-7181.
- 9- Arjmand M, Khalili G, Akbari Z, Najafi A, Shafiei A. *The metabonomic changes of leishmania major, s promastigotes (freddlin strain) after in vitro artemisinin treatment at stationary phase*. koomesh 2014; 16(1): 90-6. [Persian]
- 10- Baloch N, Nabi S, Alkahraman YMSA. *In vitro antimicrobial, insecticidal, antitumor activities and their phytochemical estimation of methanolic extract and its fractions of Medicago lupulina leaves*. World App J 2013; 23(4): 500-06.
- 11- Asadi M, Bahrami S, Ansari Samani R, Pakniat N. *Effect of hydroalcoholic extracts of Stachys lavandulifolia Vahl and Mespilus germanica leaves on Leishmania major*. Bimonthly J Hormozgan Univ Med Sci 2012; 15(4): 279-84. [Persian]
- 12- Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. *MilteFosine induced apoptotic cell death on Leishmania major and L.Tropica strains*. Korean J Parasitol 2011; 49(1): 17-23. [Persian]
- 13- Mikus J, Steverding D. *A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue*. Parasitol Int 2000; 48(3): 265-69.
- 14- Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. *Development of a semiautomated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents*. J Microbiol Methods 2006; 66(1): 79-86.
- 15- 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): 235-39.
- 16- Denizot F, Lang R. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrasodium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J Immunol Methods 1986; 89(2): 271-77.
- 17- 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.

Investigation of Antileishmanial Effect of Alcoholic Extract and Essential Oil of Medicinal Plant Leaf Black Alfalfa (*Medicago Lupulina*), on The Number of Clinical Isolates of Leishmania Major Promastigotes in Vitro

Elham Gharirvand Eskandari (MS)¹, Monir Doudi (PhD)*²

^{1,2} Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Received: 8 Jan 2016

Accepted: 7 Apr 2016

Abstract

Introduction: Leishmaniasis has created enormous global health problems. Side effects, drug resistance and the lack of effective vaccines had led to the new effective compounds effective of plants. The aim of this study was to introduce a traditional medicinal plant called Black alfalfa (*Medicago Lupulina*) that can be used as a valuable resource against cutaneous leishmaniasis.

Methods: In this experimental study, alcoholic extract was prepared by maceration and essential oil by distillation water method. *Leishmania major* promastigotes were cultured at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in N.N.N culturemedium, then in Schneider and next were cultured in RPMI- 1640. afterward, using MTT (Methyl Thiazole Tetrazolium), the IC50 (Inhibitory Concentrations 50%) for extracts, essence and Glucantime were determined. The results using Tukey and t-test were analyzed and were presented by software SPSS16. MTT assay were repeated. 3 times for each sample.

Results: IC50 for alfalfa leaf extract and essential oil of black alfalfa and Glucantime against *L. major* promastigotes was determined after 24, 48 and 72 hours, 240, 130 and 69 micrograms per ml, and 801, 340 and 190 micrograms per ml, also 26, 19 and 11 micrograms per ml , respectively. There was a significant differences between the IC50 plant extract and essential oil and Glucantime after 24, 48 and 72 hours.

Conclusion: Alcoholic extracts and essential oil the plant had significant anti leishmaniasis effects in vitro. In this way, it can be considered as an anti-leishmaniasis among the herbs.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania Major*; *Medicago Lupulina*; MTT

This paper should be cited as:

Elham Gharirvand Eskandari, Monir Doudi. *Investigation of antileishmanial effect of alcoholic extract and essential oil of medicinal plant leaf black alfalfa (*medicago lupulina*), on the number of clinical isolates of leishmania major promastigotes in vitro*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(2): 174-84.

*Corresponding author: Tel: 09131230433, email: monirdoudi@yahoo.com