مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۹۵
صفحه: ۱۸۴-۱۷۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.2, May 2016
Pages: 174-184

بررسی اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی و اسانس برگ‌های گیاه دارویی یونجه سیاه، بومی منطقه فریدن اصفهان، بر تعدادی از سوش‌های بالینی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

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

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز، 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 لیشمانیوز 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. پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور(*Leishmania major*) در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد ابتدا در محیط کشت N.N.N و سپس در محیط اشنایدر 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: IC_{50} برای عصاره و اسانس برگ های یونجه سیاه و گلوکانتیم علیه پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۴۰، ۱۳۰ و ۶۹ میکروگرم بر میلی لیتر و ۸۰۱، ۳۴۰ و ۱۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲۶، ۱۹ و ۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. بین IC_{50} 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 ضدلیشمانیایی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی بودند. به این ترتیب می‌توانند در زمره گیاهان طبی ضد لیشمانیوز مورد توجه قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز، لیشمانیا ماژور، 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 دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۱۹

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

مقدمه

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 بوده و به نام(Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis) ZCL خوانده می‌شود. لیشمانیوز جلدی شهری به انسان دوست معروف است و(Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis) ACL نام دارد. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی لیشمانیا ماژور و عامل لیشمانیوز جلدی شهری لیشمانیا تروپیکا(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 مالاریا 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 عمدتاً ترکیبات پنج ظرفیت آنتیموان می‌باشند، درمان لیشمانیوز با دشواری‌های فراوانی مواجه شده است. گزارش‌های پزشکان معالج حاکی از عود، عدم بهبود 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 مگلومین آنتی‌مونات(گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکانات(پنتوستام) به 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 میلتفوسین، آمفوتریسین B، کتوکونازول، پاروموماسین 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 روستایی به خاطر هزینه سنگین و عدم دسترسی به آن مناسب نیست(۳).

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

در پژوهشی فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره گیاه سداب کوهی را بر رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور 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. IC_{50} برای عصاره مساوی با ۸۹/۷۲±۱۸۳۲/۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای داروی آنتیموانی مساوی با ۲/۰۵±۱۷/۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در نتیجه، با توجه به عوارض داروهای آنتیموانی می‌توان از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

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

در مطالعه‌ای به دنبال ارزیابی اثر کشندگی عصاره الکلی و آبی گل همیشه بهار بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور(MRHO/IR/75/ER) در شرایط آزمایشگاهی، اعلام داشتند که عصاره‌های مزبور در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تمام انگل‌ها را کشته و غلظت‌های کمتر، فعالیت ضدلیشمانیایی وابسته به دوز نشان دادند که IC_{50} پس از ۲۴ ساعت در عصاره الکلی و آبی به ترتیب ۱۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد(۷).

براتی و همکاران، تأثیر ضدلیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی (Artemisia aucheri Boiss)، آنغوزه(Ferula assa- foetida L) و قوزه پنبه(Gossypium hirsutum) و داروی کنترل تارتارامتیک را بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به روش MTT در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و نتایج به صورت IC_{50} برای هر کدام از عصاره‌ها به صورت جداگانه محاسبه شد. IC_{50} عصاره‌های درمنه کوهی، آنغوزه و قوزه پنبه به ترتیب ۵/۹، ۵، ۷/۵ و ۳/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان IC_{50} تارتارامتیک برابر با ۴/۷ 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 ماژور 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 ۲۷۹/۴۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴۲/۸۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود(۹).

ازجمله داروهای ضدلیشمانیایی که منشأ دارویی دارد، می‌توان به آرتمیزینین اشاره کرد. آرتمیزینین یک ترپن لاکتون جدا شده از گیاه درمنه آنوا(Artimisia annua) است که به عنوان داروی ضد مالاریا و ضد لیشمانیا شناخته شده است. این دارو در شرایط آزمایشگاهی با تغییر در متابولیت‌های مربوط به چرخه‌های متابولیسمی مختلف ازجمله مسیر متابولیسمی گالاکتوز، مسیر بیوسنتز اسفنگولیپید و همچنین مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین منجر به توقف فعالیت انگل لیشمانیا ماژور 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- 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 ۰/۱۸±۲۹/۰۲) در حالی که فراکسیون کلروفرم فعالیت قوی‌تری را نشان داده بود و قطر هاله‌ای برابر با (میلی‌متر ۰/۰۴±۲۶/۰۲) 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 ۰/۲±۳۶/۰۲) و(میلی‌متر ۰/۰۹±۴۲/۱۶) از خود نشان داد. فراکسیون کلروفرم فعالیت خوبی علیه کاندیدا گلابراتا با قطر هاله‌ای برابر با(میلی‌متر ۰/۰۹±۳۲/۰۳) از خود نشان داد. عصاره متانولی فعالیت کشندگی قوی ضد حشره‌ای علیه حشره تریبولیم 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 کشندگی قوی عالی علیه حشره تریبولیوم کاستانئوم به میزان ۷۰ درصد از خود نشان داد. عصاره متانولیک این گیاه فعالیت فوق العاده ضد توموری به میزان ۸۹/۴۰ درصد از خود نشان داد. به علاوه برآورد فیتوشیمیایی عصاره‌ها

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

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

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

به دلیل خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد توموری، ضد حشره‌ای و ضدزخم گیاه یونجه سیاه، 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.

شکل ۱: تصویر تهیه شده از نمونه ای از گیاه یونجه سیاه جمع آوری 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 ضدلیشمانیایی عصاره الکلی و اسانس برگ‌های گیاه یونجه سیاه را بر پروماستیگوت‌های ایزوله بالینی انگل لیشمانیا ماژور 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 ۰۷۳/۰۰۹/۰۰۱ در فصل بهار از مراتع شهرستان فریدن واقع در استان اصفهان شناسایی و جمع‌آوری گردید.

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(۲۵-۲۰ 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(۷،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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

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 متانول(مجللی، ایران) چند دقیقه فیکس گردید و با گیمسا(کارن اطلس پژوه، ایران) به مدت ۳۰ -۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. لام‌ها زیر میکروسکوپ نوری (Nikon، ژاپن) با لنز ۴۰x مورد بررسی اولیه و سپس با لنز روغنی ۱۰۰x جهت مشاهده اشکال آماستیگوت انگل، آزمایش شد. آزمایش مستقیم از نظر آماستیگوت مثبت بود(۱۳).

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

جدول ۱: دستورالعمل بهینه‌شده برای انجام PCR

ردیف	مواد	غلظت اولیه	غلظت نهایی	حجم
۱	بافر PCR	10x	1x	2.5 µL
۲	$MgCl_2$	50 mM	1.5 mM	0.75 µL
۳	dNTPmixed	10 mM	0.2 mM	0.5 µL
۴	پرایمرها(F+R)	100 Pmol/µL	10 Pmol/µL	2.5 µL
۵	Template DNA	-	100 ng	1(1-5) µL
۶	Taq پلیمراز	5 U/ml	1.2 U/ml	0.2 µL
۷	آب مقطر استریل	-	-	Up to 25 µL
	حجم کل	-	-	25 µL

جدول ۲: سیکل حرارتی استفاده شده برای PCR

مواد	دما	زمان	سیکل
Initial denaturation	95°c	5 min	1 cycle
Denaturation	95°c	20 sec	
Annealing	50°c	30 sec	30 cycle
Extention	72°c	1 min	
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	CTGGATCATTTTCCGATG	18
Reverse	L5.8s	TGATACCACTTATCGCACTT	20

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، 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

پن- استرپ(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(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 (Himedia، هندوستان) انتقال یابند(۱۴).

عصاره الکلی خشک شده در دمای معمولی، با استفاده از ۲ سی‌سی آب مقطر استریل و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) (سیناژن، ایران) رقیق‌سازی شد. برای خشک کردن اسانس فقط از DMSO استفاده شد. از DMSO به عنوان امولسیفایر استفاده شد. سپس برای بررسی تأثیر عصاره الکلی و اسانس 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(۱۱).

داروی گلوکانتیم(SIGMA، آمریکا) یکی از بهترین داروهای رفرانس جهت از بین بردن این انگل می‌باشد که ابتدا مقدار لازم از آن در بافر فسفات(PBS: Phosphate balancedsaline) (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(۱۴).

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی انگل به صورت دو میلیون انگل در میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد، سپس ۴۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره، اسانس 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 ۳۴-۳۳ درجه سانتی‌گراد اینکوبه گردید. 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 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 سانتی‌گراد، 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 لیشمانیا ماژور بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید و بر اساس درصد پروماستیگوت‌های زنده و غلظت‌های مورد استفاده از گلوکانتیم، عصاره و اسانس نموداری رسم شد و با استفاده از نمودار، مقدار IC_{50} تعیین گردید و داده‌ها با استفاده از تست Tukey و آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند(۱۴).

IC_{50} غلظتی از عصاره است که از رشد ۵۰ درصد پروماستیگوت‌های انگل جلوگیری به عمل می‌آورد(۷).

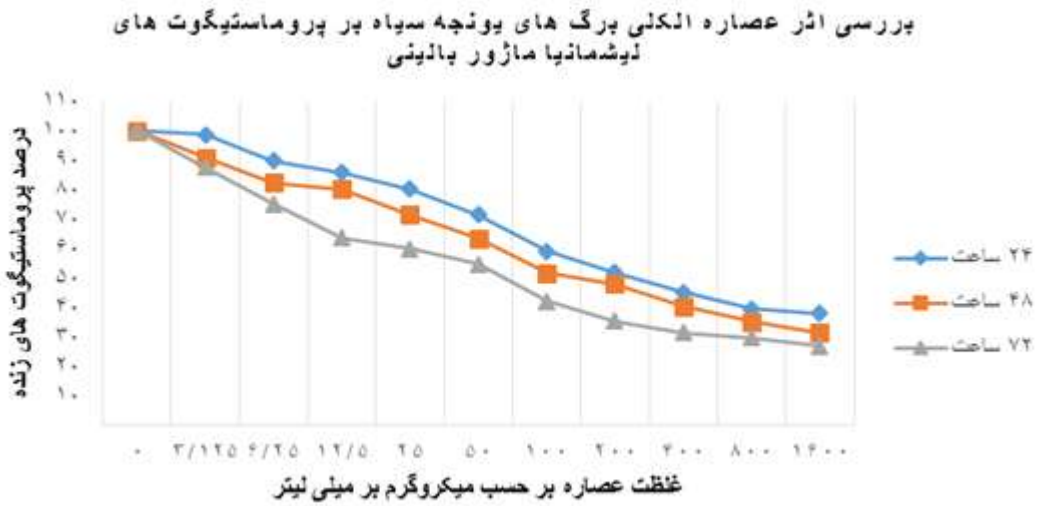
$$\text{Viable Cells Percent} = [(AT - AB) / (AC - AB)] \times 100$$

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

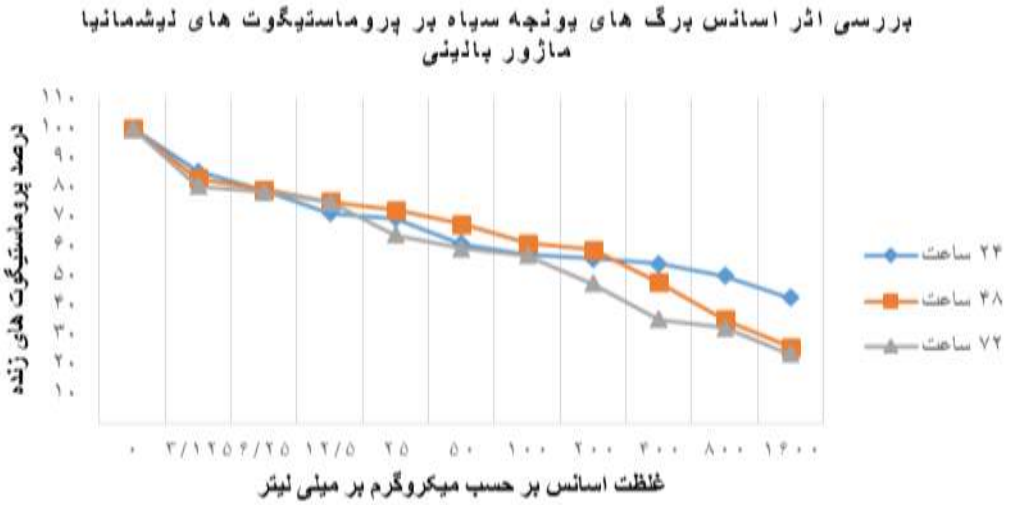
نتایج

نتایج بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره الکلی و اسانس یونجه سیاه 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(سویه بالینی) تحت شرایط In vitro به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار ۱ و ۲ ارائه شده است:



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 ماژور(سویه بالینی) تحت شرایط In vitro به روش MTT 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 ماژور(سویه بالینی) در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۴۰، ۱۳۰ و ۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

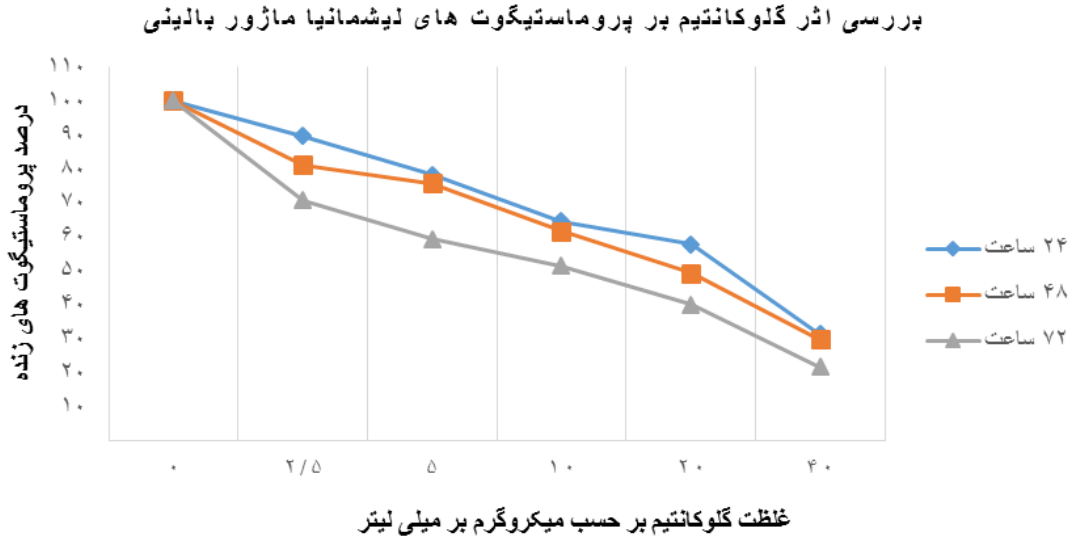


نمودار ۲: محاسبه IC_{50} اسانس برگ‌های یونجه سیاه با استفاده از نتایج به دست آمده حاصل از اثر غلظت های مختلف آن بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (سویه بالینی) تحت شرایط In vitro به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (نمودار آبی رنگ: ۲۴ ساعت، نمودار قرمز رنگ: ۴۸ ساعت، نمودار خاکستری رنگ: ۷۲ ساعت).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

با توجه به نمودار ۲، IC_{50} برای اسانس برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور(سویه بالینی) در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۸۰۱، ۳۴۰ و ۱۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

از داروی گلوکانتیم نیز به عنوان گروه کنترل جهت مقایسه اثربخشی عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور(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:



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

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

بحث

با توجه به گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی مبنی بر این‌که لیشمانیوز از خطرناک‌ترین بیماری‌های عفونی است و این‌که 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 روبیاسه آ(Cinchona succirruba) به عنوان داروی ضدمالاریا استفاده شده است(۶).

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 به وسیله لام هموسایتومتر بهره گرفته شده است که روشی زمان بر و غیر مناسب است(۱۵).

روش‌های رنگ سنجی که برای بررسی رشد و زنده 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 فاقد 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 بررسی 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 حشره ای و ضد توموری

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

هستند، گیاه یونجه سیاه انتخاب شد و تأثیر عصاره الکلی و اسانس برگ‌های آن را بر رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور(سویه بالینی) مطالعه و بررسی گردید.

IC_{50} برای عصاره و اسانس برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۴۰، ۱۳۰ و ۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۸۰۱، ۳۴۰ 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 ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری وجود داشت($p<۰/۰۵$). 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 می شود 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 برگ های گیاه یونجه سیاه علیه فرم آماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور و زخک سالک مورد بررسی قرار نگرفت و این دو مورد از کاستی های مهم این پژوهش به حساب می‌آیند.

نتیجه‌گیری

در این پـــروژه اثر ضد لیشـمانیـایی عصاره الکلـی و اسانـــس برگ‌های یونجه سیاه در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که دارای اثرات ضد لیشمانیایی می‌باشند. با این حال ضرورت انجام آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی آن‌ها بر روی انگل لیشمانیا 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(آماستیگوت) است و برای این که عصاره الکلی و اسانس برگ‌های یونجه سیاه را به عنوان یک ماده ضد لیشمانیایی بدانیم، نیاز است این مطالعات صورت بگیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی بیماری‌های عفونی و گرمسیری صدیقه طاهره اصفهان، مسئول محترم هرباریوم 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 یاری رسانده‌اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

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, Gaddaguti 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

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 Antomony 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- Ogeto TK, Odhiambo RA, Shivairo RS, Muleke CI, Osero BO, Anjili C, et al. ***Antileishmanial activity of Aloe secandiflora 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 (fredlin 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 tetrasolium 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

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 ± 2° 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-08]

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