Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره۹، دی۱۳۹۲(شماره پی در پی۸۱)

مقاله پژوهشی

تأثیر اسانس‌های گیاهان مرزه و سیاه دانه بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور

خداداد پیرعلی خیرآبادی[۱*]، امیر دهقانی سامانی[۲]، میلاد عادل[۳]، فاطمه حسین پور[۴]

[۱] گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۲] گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۳] دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران ، [۴] گروه علوم پایه، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیازیس از جمله بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که به وسیله انگل تک‌یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. از دیرباز از گیاهان دارویی برای اثرات موضعی و عمومی‌لیشمانیازیس استفاده می‌شد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر اسانس‌های گیاهان مرزه و سیاه دانه بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی اثرات اسانس های گیاهان مرزه و سیاه دانه بر روی فرم پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* بررسی شد. ارزیابی این مطالعه بر اساس میانگین انگل‌های زنده در فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا پس از مجاورت با غلظت‌های مختلف گیاهان دارویی و داروی شیمیایی گلوکانتیم با دوز مشخص در فواصل زمانی مختلف بود. به این منظور عصاره‌های مختلف با نسبت‌های۰/۱، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۸، ۱/۲، ۱/٦ و ۲ درصد اضافه شد. گروه‌های مختلف این مطالعه در دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور (گرم‌خانه) و در شرایط یکسان نگهداری شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت، انگل‌ها از انکوباتور خارج شده و تعداد انگل‌های زنده شمارش شد. داده‌ها با آزمون‌های آمار توصیفی، تست توکی و جی ام ال تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بین گروه‌های دریافت کننده اسانس‌های مرزه و سیاه دانه با داروی گلوکانتیم، اختلاف معنی‌داری در کاهش انگل‌ها وجود داشت($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش مقاومت‌های دارویی به انگل لیشمانیا می‌توان از اسانس‌های گیاهی نظیر مرزه و سیاه دانه به عنوان درمان جایگزین برای کنترل بیماری لیشمانیازیس استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، مرزه، سیاه دانه، لیشمانیازیس

***نویسنده مسئول: دکتر خداداد پیرعلی خیرآبادی**، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی
Email: khpirali@yahoo.com

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

مقدمه

لیشمانیازیس بیماری‌مشترک بین انسان و حیوان است و به وسیله انگل تک‌یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. این بیماری در بسیاری از کشورهای گرمسیر به صورت اندمیک دیده می‌شود (۱). از آنجا که انتشار جغرافیایی بیماری وابسته به عوامل گوناگون از جمله شرایط اقلیمی‌مناسب(آب و هوا، گرما، رطوبت) و میزبانان واسط مناسب است(۲)، این احتمال که با مهیا شدن شرایط، بیماری به مناطق دیگر گسترش یابد(به ویژه در مناطق که هم جوار با مناطق آندمیک و حتی هایپراندمیک می‌باشند)، را افزایش می‌دهد(۳). به همین دلیل سازمان جهانی بهداشت برای مبارزه و کنترل این بیماری اهمیت ویژه‌ای قائل می‌باشد و آن را جزء مهم‌ترین برنامه‌های خود قرار داده است(۴). لیشمانیازیس از لحاظ پیامدها و نشانه‌های بالینی به ۴ دسته اصلی تقسیم‌بندی می‌شود؛ شکل پوستی؛ خفیف‌ترین شکل بیماری است. در این نوع از لیشمانیازیس زخم‌هایی بر روی پوست صورت، دست‌ها و پاها ایجاد می‌شود. این آسیب‌ها پس از چند ماه بهبود می‌یابند، ولی اثرات زخم‌ها بر روی پوست باقی می‌ماند(۵). شکل پوستی منتشره؛ باعث ایجاد زخم‌های منتشر و مزمن شبیه جزام می‌شود. این شکل به وسیله‌ی تشکیل ندول‌ها و لومپ‌ها و پلیت‌های، متعدد به خصوص در صورت و سطح خارجی ران‌ها شناخته می‌شود(۶). شکل پوستی ـ مخاطی؛ بیشتر منجر به بدشکل شدن صورت به دلیل آسیب به پیوندگاه بافت مخاطی و پوستی در مناطقی هم چون دهان و بینی می‌شود. در این شکل زخم‌ها می‌توانند تا حدودی یا به طور کامل، مخاط بینی، دهان، ناحیه‌ی حلق و بافت‌های اطراف را از بین ببرند(۷). لیشمانیازیس احشایی؛ تحت نام کالاآزار نیز شناخته می‌شود. لیشمانیازیس احشایی نشانه‌های بالینی نظیر؛ تب بالا، کاهش وزن، تورم کبد و طحال و کم‌خونی را نمایان می‌سازد. در صورتی که شکل احشایی درمان نشود مرگ طی دو سال حتمی است(۸).

به طور تاریخی شیمی درمانی لیشمانیازیس بر پایه‌ی فلزات سنگین سمی‌به ویژه ترکیبات آنتیموان قرار گرفته است(۹). هنگامی که این نوع از درمان مؤثر نباشد، داروهای دیگری چون پنتامیدین و آمفوتریسین B استفاده می‌شود(۱۰). همه این ترکیبات دارویی نیاز به تجویز تزریقی و مراقبت بالینی یا بستری کردن در حین درمان دارند، چرا که پیامدهای بعدی آنها می‌تواند بسیار شدید باشد(۱۱).

گیاه مرزه با نام علمی *Satureia hortensis* از تیرهٔ نعناعیان[1] که حاوی اسانس می‌باشد. گیاهی است علفی، یک ساله و دارای ساقه منعشب، به طول ۳۰ـ۱۰ سانتی‌متر که به سهولت در اثر دارا بودن ظاهری به رنگ سبز خاک‌آلود یا مایل به خاکستری، از گونه‌های مجاور تشخیص داده می‌شود. رنگ ساقه آن تیره‌تر از برگ است(۱۲). به نظر می‌رسد که نخستین بار در ایتالیا اقدام به پرورش این گیاه شده

1-Labiatae

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

باشد. پزشکان قرون وسطی برای آن اثر معالجه نقرس قائل بودند و در قرون ۱۵ و ۱٦ میلادی مردم آن را دارویی مقوی، سقط کنندهٔ جنین و رفع فلج می‌دانستند(۱۳). در سال ۱۵۸۲ میلادی موفق به استخراج اسانس از مرزه شدند. مرزه دارای اثرات ضد باکتریایی مشهودی روی میکروب‌های مولد اسهال می‌باشد و مصرف آن در مواقعی که همراه اسهال، یک عامل عفونی نیز دخالت دارد بسیار مؤثر می‌باشد(۱٤). طبق تحقیقات به عمل آمده اسانس مرزه همانند دیفنوکسیلات به راحتی می‌تواند سبب از بین رفتن حرکات انقباضی روده شده و به نگهداری آب و الکترولیت‌ها کمک نماید. اسانس مرزه از مخاط جذب و بعد از ورود به کبد به شکل ترکیبات کونژوگه گلیکورونیک و سولفوریک اسید و کینون از راه ادرار دفع می‌شود. هم چنین مرزه رشد باکتری و قارچ را مهار می‌کند و دارای اثرات ضد عفونی می‌باشد(۱۵).

سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sataria* گیاهی یک‌ساله و گل دار و بومی‌جنوب غربی آسیا است. در ایران این گیاه به ویژه در اراک و اصفهان به فراوانی می‌روید. سیاه‌دانه از راستهٔ گل‌های ساعت[۱] و تیرهٔ آلالگان[۲] است(۱۶). دانه‌اش دارای اثر قاعده‌آور، ضدکرم، ضد باکتری، مسهل و زیاد کننده ترشحات شیر است. هم‌چنین از دانه‌های آن، اثر ضد توموری و ضد باکتری نیز مشاهده شده و ممکن است اثر ضد نفخی آن مربوط به داشتن اثر ضد باکتریایی آن باشد(۱۶). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اسانس‌های گیاهان مرزه و سیاه دانه بر روی فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، مواد استفاده شده شامل؛ محیط کشت *N.N.N*، محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640، محیط کشت *BHI* [۳] آگار، رنگ حیاتی تریپان بلو ۱۰ درصد، اسانس روغنی گیاهان مرزه و سیاه دانه، فرمالین ۱۰ درصد، آمپول گلوکانتیم، شکل پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور، خون تازه‌ی خرگوش، هپارین و DMSO [۴] بود. در محیط کشت N.N.N ترکیب آگار- آگار به وسیله آگارهای غنی‌تری مثل BHIA جایگزین می‌شود که به آن محیط کشت N.N.N تغییر یافته می‌گویند. مواد مورد نیاز برای ساخت این محیط کشت در ۱۰۰ میلی‌لیتر شامل؛ آگار ۱/۴ گرم، کلرید سدیم ۰/۸ گرم، گلوکز ۰/۲ گرم و پودر BHI ۳/۷ گرم می‌باشد.

مواد بالا در یک بالن ریخته و به آن آب مقطر استریل افزوده شد تا حجم کلی مواد به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. سپس آن را روی صفحه‌ای داغ یا هیتر گذاشته و داخل بالن یک آهن ربا انداخته شد تا مواد به خوبی با هم مخلوط شدند و در نتیجه آگار شفاف گردید. این مواد را در ارلن ریخته و درب ظرف با پنبه‌ای که در

1-Ranunculales
2-Ranunculaceae
3-Brain Heart Infusion (BHI)
4-Di Methyl Sulfo Oxide (DMSO)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

فویل آلومینیومی پیچیده شده بود، بسته شد و در اتوکلاو با حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ و به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از اتمام اتوکلاو، زمانی که دمای آگار به حدود ۵۰ درجه رسید، در زیر هود و در شرایط استریل کامل به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ۲۰ میلی‌لیتر خون تازه خرگوش که حاوی هپارین شده بود به محیط کشت اضافه گردید.

جهت تهیه ی محیط کشت RPMI 1640 ، پودر تجاری RPMI 1640 ۱۰/۴ گرم، بیکربنات سدیم ۲ گرم و آب مقطر ۹۰۰ میلی‌لیتر به کار رفت. برای تهیه یک لیتر از این محیط کشت، ۸۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در ارلن ریخته شد و آهن ربا درون آن قرار داده شد و بر روی دستگاه هم زن مغناطیسی قرار گرفت و در حالی که آب به وسیله مگنت مخلوط می‌شد، پودر تجاری RPMI 1640 اضافه شد و تا زمان حل شدن کامل پودر ادامه یافت. سپس بی‌کربنات به محلول افزوده شد و هم زدن تا حل شدن کامل پودر ادامه یافت، در این مرحله PH محیط اندازه‌گیری شده و با استفاده از سود یا اسید کلریدریک به میزان ۷/۲ تنظیم گردید. در پایان حجم محیط با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرونی و دستگاه فیلتراسیون پمپ خلاء استریل شد و در شیشه‌های درپیچ‌دار استریل تقسیم گردید. پس از نوشتن اسم و تاریخ ساخت محیط کشت بر روی ظرف‌ها، در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریک نگهداری شد. برای اطمینان از آلوده نشدن مقدار اندکی از محیط را در ظرف کوچکی ریخته و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. از این محیط به عنوان یک محیط تک‌فازی همراه با FCS[1] ۱۰ تا ۲۰ درصد، به عنوان ماده مکمل جهت کشت انگل استفاده شد. به منظور جلوگیری از آلوده شدن محیط کشت به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط یک ویال آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین و استرپتومایسین افزوده شد. محیط‌های کشت به طور مرتب، یک روز در میان از نظر وجود یا عدم وجود پروماستیگوت، تعداد و حرکت آنها و آلودگی‌های ثانویه باکتریایی و قارچی مورد بررسی قرار گرفت. این کار با قرار دادن یک قطره از مایع رویی محیط کشت در کنار شعله روی لام و بررسی به وسیله بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۴۰ میکروسکوپ نوری انجام می‌شد. در صورت وجود انگل‌های کافی و با حرکت مناسب، به محیط BHI افزوده و بسته به وضعیت انگل‌ها، یک تا دو روز بعد روی محیط N.N.N جدید پاساژ داده می‌شد. در صورت مشاهده‌ی باکتری مقداری آنتی‌بیوتیک افزوده می‌شد، ولی در صورت مشاهده قارچ محیط کشت دور ریخته می‌شد، چرا که داروی ضد قارچ سبب کشته شدن انگل‌ها می‌شد و از طرف دیگر قرار دادن محیط کشت آلوده در کنار محیط‌های سالم باعث انتقال اسپورهای قارچی بین

1-Fetal Calf Serum (FCS)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

محیط‌های کشت می‌شد. پس از بررسی، محیط‌های کشت در انکوباتور قرار داده شدند تا روز بعد دوباره مورد بررسی قرار گیرند(۷).

در این مطالعه شکل پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* سویه MRHO/IR/ER/75 از گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. در محیط‌هایی که انگل‌ها دارای رشد و حرکت زیاد بودند و به عبارت دیگر در مرحله لگاریتمی قرار داشتند، مایع رویی محیط به یک شیشه استریل منتقل شد و تحت شرایط استریل کامل، محیط کشت RPMI 1640 با حجم مساوی به شیشه حاوی انگل‌های زنده افزوده شد و پس از نوشتن شماره و تاریخ پاساژ در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به شیشه اصلی که مایع رویی آن برداشت شده بود مقداری BHI افزوده شد. پس از انتقال انگل‌ها از محیط N.N.N به محیط BHI به طور یک روز در میان مورد بررسی قرار گرفتند. در صورتی که تعداد انگل‌ها زیاد شده بود به محیط جدید منتقل شده و در صورتی که افزایشی رخ نداده بود، شیشه‌ها دوباره به انکوباتور بازگردانده می‌شدند. در صورتی که افزایش تعداد انگل‌ها با تخریب آنها همراه شده بود مقداری از آن به محیط کشت دو فازی منتقل شد تا از بین برود و به باقی مانده مقداری RPMI 1640 اضافه گشت. در مورد پاساژ از محیط RPMI 1640 به یک محیط RPMI 1640 تازه و مغذی پس از انجام سانتریفیوژ (با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۷ دقیقه)، مایع رویی دور ریخته و به باقی مانده محیط جدید RPMI 1640 افزوده شد و با دستگاه ورتکس به مدت ۱ دقیقه انگل‌های رسوب‌کرده در محیط کشت پخش شدند (۱۵).

به منظور تهیه اسانس‌های روغنی مورد نیاز در انجام این مطالعه، در گام نخست مقدار ۲۰ کیلوگرم از بخش‌های هوایی خشک شده ی هر گیاه شامل برگ و ساقه‌های هوایی گیاه مرزه با شماره هرباریومی KF 1384 و سیاه دانه با شماره هرباریومی KF 1185 که محصول همان سال بودند از موسسه تحقیقاتی گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد و به صورت پودر شده در آمد. سپس در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد با کمک بخش باغبانی با دستگاه کلونجر و بر اساس روش تقطیر آبی[1] اسانس روغنی حاصل شد. مقدار ۳۰ میلی لیتر اسانس روغنی از هر گیاه توسط دستگاه کلونجر تهیه شد (۱۷).

آمپول گلوکانتیم از آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه اصفهان تهیه شد. هر آمپول حاوی ۱/۵ گرم دارو به ازای هر ۵ میلی‌لیتر بوده و میزان درمانی آن برای کشتن انگل، ۲۰ میکرومول است. پس از انجام محاسبه‌های لازم میزان گلوکانتیم برای هر میلی‌لیتر انگل *لیشمانیا ماژور*، ۳۳۸ میکرولیتر به دست آمد.

به منظور حل کردن اسانس روغنی در محیط کشت RPMI 1640 که یک محیط آبی می‌باشد، از دی متیل سولفوکساید DMSO استفاده شد. غلظت مؤثر این ترکیب برای محلول کردن اسانس‌های روغنی

1-Hydro Distillation

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

اسطوخودوس در محیط RPMI1640 با آزمون و خطا در محیط کشت، ۵ درصد مشخص شد (۳). تعداد ابتدایی انگل در این مطالعه $۱۰^{۶}$×۱بود و انگل‌ها پیش از افزودن به محیط کشت به وسیله لام هموسیتومتر مورد شمارش قرار گرفتند. به این منظور از مایع رویی محیط کشت مقدار کمی(۱۰ میکرولیتر) برداشته و به همان میزان فرمالین ۱۰ درصد برای ثابت‌کردن و شمارش ساده‌تر انگل‌ها استفاده شد. به منظور شمارش انگل از لام نئوبار استفاده شد و میزان شمارش شده در یک مجموعه ۲۵ تایی، در $۱۰^{۴}$ ضرب شده و مقدار انگل در هر میلی‌لیتر به دست آمد. پس از شمارش انگل و به دست آمدن انگل در هر میلی‌لیتر، عصاره های مختلف که مقدار لازم برای انجام آزمایش با آزمون و خطا به دست آمده بود، با نسبت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۸، ۱/۲، ۱/٦ و ۲درصد که مساوی با حجم‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۶۰ میکرولیتر در ۱ میلی لیتر انگل بود اضافه شد. در غلظت های بالاتر از ۱/۲ درصد، هیچ انگل زنده‌ای مشاهده نشد و به همین دلیل از اسانس های رقیق شده (درصدهای۰/۱، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲) استفاده شد. بقیه گروه ها شامل یک گروه شاهد حاوی $۱۰^{۶}$ انگل (کنترل منفی)، گروه دیگر حاوی ۳۳/۸ درصد گلوکانتیم و $۱۰^{۶}$ انگل (کنترل مثبت) و همین طور یک گروه حاوی ۵ درصد DMSO و $۱۰^{۶}$ انگل بودند. گروه‌های مختلف این مطالعه در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور(گرم‌خانه) و در شرایط یکسان نگهداری شدند. تمامی مراحل انجام آزمایش که در بالا گفته شد به صورت استریل و زیر هود انجام گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، انگل‌ها از انکوباتور شده خارج شده و تعداد انگل‌های زنده شمارش شد. در این بخش از تریپان بلو ۱۰ درصد، که نوعی رنگ حیاتی است و فقط انگل‌های مرده را رنگ می‌کند، استفاده شد. این رنگ حیاتی به شناسایی سلول‌های زنده از مرده کمک می‌کند. پس از نمونه‌برداری در شرایط استریل، محیط کشت به گرم‌خانه ۲۶ درجه بازگردانده شد. در ساعت ۴۸ و ۷۲ نیز با روش گفته شده در بالا، انگل‌های زنده شمارش و ثبت گردید. به منظور تأیید نتایج، مراحل انجام کار ۳ بار تکرار شد تا در تحلیل آماری نتایج کاذب حذف شوند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آمار توصیفی، تست توکی و جی ام ال تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

میانگین انگل‌های زنده پس از اضافه کردن اسانس‌های گیاهی و داروی شیمیایی در زمان‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. به طور کلی تعداد انگل‌های زنده در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن گیاه مرزه و سیاه دانه با گروه کنترل منفی که هیچ دارویی دریافت نکرده بود، اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$).

نتایج حاصله نشان داد که پس از گذشت ۲٤ ساعت از افزودن اسانس و داروی شیمیایی، غلظت ۲

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

درصد از اسانس روغنی مرزه و سیاه دانه از نظر کاهش در تعداد انگل دارای اختلاف معنی‌داری بود (p<۰/۰۵) و هم‌چنین دو دارو در غلظت ۰/۸ درصد نیز دارای اختلاف معنی‌داری بودند، ولی در سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری نشان ندادند(p<۰/۰۵) (جدول ۲).

در زمان ۴۸ کاهش تعداد انگل در غلظت ۰/۱ درصد از اسانس مرزه با غلظت ۲ درصد از این گیاه تفاوت معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵)، ولی در مورد گیاه سیاه دانه چنین نتیجه‌ای معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵)(جدول ۳).

در زمان ۷۲ غلظت ۰/۱ درصد مرزه با غلظت‌های ۴/ تا ۲ درصد همین اسانس و با غلظت‌های ۴/ تا ۲ درصد اسانس سیاه دانه و هم‌چنین با داروی شیمیایی و کنترل، اختلاف معنی‌دار نشان داد (p<۰/۰۵). گروه کنترل نیز با تمام غلظت های هر دو اسانس دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). گروه کنترل و گروه گلوکانتیم نیز با هم در کاهش تعداد انگل‌های زنده تفاوت معنی‌دار را نشان دادند که نشان دهنده تأثیر این دارو بر انگل‌ها و از بین بردن آنها با گذشت زمان بیشتر است (p<۰/۰۵)(جدول ۴).

جدول ۱ : مقایسه میانگین و انحراف معیار تعداد انگل های زنده در زمان های مختلف در مجاورت عصاره گیاه و یا دارو

زمان / عصاره یا دارو	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
مرزه	* ab ۲/۳۴۵±۱۹/۴۵	ab۲/۰۸۳±۱۷/۱۰۶	ab ۴/۴۷۳±۱۸/۹۱۶
سیاه دانه	b ۲/۲۸۳±۲۹/۱۷۶	b ۲/۲۲۳±۲۲/۰۷۸	b ۱/۷۸۳±۱۶/۴۵۶
گلوکانتیم	c /۶۸۳±۹۷/۱۰۶	c۱/۶۲۳±۸۷/۳۹۱	c /۹±۵۹/۶۳۶
کنترل	cd /۰۰±۱۰۵/۰۰۰	d /۰۰±۱۴۹/۰۰۰	d /۰۰±۱۳۰/۰۰۰

* حروف لاتین نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

جدول ۲ : مقایسه میانگین و انحراف‌معیار تعداد انگل‌های زنده پس از اضافه کردن اسانس های گیاهی در گروه های مورد آزمایش پس از۲۴ ساعت.

درصد / عصاره یا دارو	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۸	۱/۲	۱/۶	۲
مرزه	× e ۴/۳۲±۴۱/۶۷	ed۴/۳۲±۳۷/۰۲	ed۴/۳۲±۲۹/۴۶	e۴/۳۲±۳۰/۸۰	ea۴/۳۲±۲۲/۹۶	ea۴/۳۲±۱۸/۸۰	ea۴/۳۲±۱۶/۵۵
سیاه دانه	ce۴/۳۲±۳۵/۹۳	ae۴/۳۲±۲۹/۲۸	ae۴/۳۲±۱۹/۶۴	c۴/۳۲±۱۵/۰۸	ac۴/۳۲±۱۳/۸۹	ac۴/۳۲±۱۳/۱۵	a۴/۳۲±۱۶/۵۵
گلوکانتیم	f/۶۸±۹۸/۶۸	f/۶۸±۹۸/۶۸	f/۶۸±۹۸/۶۸	f/۶۸±۹۸/۶۸	f/۶۸±۹۸/۶۸	f/۶۸±۹۸/۶۸	f/۶۸±۹۸/۶۸
کنترل	f/۰۰±۱۰۷/۰۰	f/۰۰±۱۰۷/۰۰	f/۰۰±۱۰۷/۰۰	f/۰۰±۱۰۷/۰۰	f/۰۰±۱۰۷/۰۰	f/۰۰±۱۰۷/۰۰	f/۰۰±۱۰۷/۰۰

* حروف لاتین نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار است (p<۰/۰۵).

جدول ۳ : مقایسه میانگین و انحراف‌معیار تعداد انگل‌های زنده پس از اضافه کردن اسانس های گیاهی در گروه های مورد آزمایش پس از۴۸ ساعت.

درصد / عصاره یا دارو	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۸	۱/۲	۱/۶	۲
مرزه	× ac۴/۸۵±۲۸/۵۶	ac۴/۸۵±۲۸/۴۹	ac۴/۸۵±۲۵/۶۶	ac۴/۸۵±۲۷/۶۲	ac۴/۸۵±۱۷/۹۶	ac۴/۸۵±۱۸/۹۲	ac۴/۸۵±۱۶/۵۲
سیاه دانه	bc۴/۸۵±۳۳/۵۳	ab۴/۸۵±۲۱/۹	ab۴/۸۵±۱۸/۷۱	ab۴/۸۵±۱۳/۸۵	ab۴/۸۵±۱۲/۵۶	ab۴/۸۵±۱۱/۷۵	a۴/۸۵±۶/۹۵
گلوکانتیم	f/۶۸±۸۷/۳۹	f/۶۸±۸۷/۳۹	f/۶۸±۸۷/۳۹	f/۶۸±۸۷/۳۹	f/۶۸±۸۷/۳۹	f/۶۸±۸۷/۳۹	f/۶۸±۸۷/۳۹
کنترل	g/۰۰±۱۰۷/۰۰	g/۰۰±۱۰۷/۰۰	g/۰۰±۱۰۷/۰۰	g/۰۰±۱۰۷/۰۰	g/۰۰±۱۰۷/۰۰	g/۰۰±۱۰۷/۰۰	g/۰۰±۱۰۷/۰۰

* حروف لاتین نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار است (p<۰/۰۵).

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

جدول ۴: مقایسه میانگین و انحراف‌معیار تعداد انگل‌های زنده پس از اضافه کردن اسانس های گیاهی در گروه های مورد آزمایش پس از ۷۲ ساعت.

درصد / عصاره یا دارو	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۸	۱/۲	۱/۶	۲
مرزه	× abd ۷/۱۱±۲۶/۹۶	abd ۷/۱۱±۲۲/۶۳	bd ۷/۱۱±۱۷/۳۴	cd ۷/۱۱±۱۹/۲۳	bd ۷/۱۱±۱۴/۹۶	cd ۷/۱۱±۱۲/۰۲	bc ۷/۱۱±۱۰/۴۵
سیاه دانه	a۷/۱۱±۵۵/۴۱	abc۷/۱۱±۲۰/۴۵	bd۷/۱۱±۱۷/۳۷	bd۷/۱۱±۱۲/۱۹	bd۷/۱۱±۱۰/۸۵	bd۷/۱۱±۹/۵۲	bd۷/۱۱±۴/۸۵
گلوکانتیم	f/۹۵±۶۱/۳۹	f/۹۵±۶۱/۳۹	f/۹۵±۶۱/۳۹	f/۹۵±۶۱/۳۹	f/۹۵±۶۱/۳۹	f/۹۵±۶۱/۳۹	f/۹۵±۶۱/۳۹
کنترل	g/۰۰±۱۰۶/۰۰	g/۰۰±۱۰۶/۰۰	g/۰۰±۱۰۶/۰۰	g/۰۰±۱۰۶/۰۰	g/۰۰±۱۰۶/۰۰	g/۰۰±۱۰۶/۰۰	g/۰۰±۱۰۶/۰۰

* حروف لاتین نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار است (p<۰/۰۵).

بحث

با توجه به افزایش مقاومت‌های دارویی و هم‌چنین نظر به بروز عوارض جانبی پس از مصرف داروهای شیمیایی، توجه محققان به سمت یافتن داروهای طبیعی و جایگزین برای درمان بیماری‌ها جلب شده است. از جمله بیماری‌هایی که درمان آن بسیار دشوار و طولانی مدت می‌باشد، لیشمانیازیس می‌باشد(۱۹ و ۱۸). در این مطالعه سعی شد تا اثر اسانس‌های گیاهان مرزه و سیاه دانه بر روی فرم پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* بررسی شود.

ارزیابی این مطالعه بر اساس میانگین انگل‌های زنده در فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا پس از مجاورت با غلظت‌های مختلف گیاهان دارویی و داروی شیمیایی با دوز مشخص در فواصل زمانی مختلف بود. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱/۲ اسانس‌های روغنی استفاده شده دارای اثرات لیشمانیا کشی بالقوه‌ای است، چرا که پس از افزودن این اسانس‌ها به محیط کشت، انگل زنده‌ای مشاهده نشد. ماکادو و همکاران(۲۰۱۰)، اثر چندین اسانس روغنی را بر روی رشد شکل پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم*، در محیط آزمایشگاهی گزارش کردند. در بین این گیاهان مؤثر بر لیشمانیا، اسطوخودوس سبز[1]، با میانگین غلظت ۲۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی *لیشمانیا اینفانتوم* مؤثر بوده است (۲۰). جعفری و همکاران در یک کارآزمایی بالینی روی ۱۶۵ نفر از بیماران از عصاره جوشانده و هیدروالکلی میوه گیاه فلوس[2] بر روی لیشمانیازیس پوستی استفاده کردند. در این مطالعه در گروه جوشانده فلوس ۴۰ درصد و در گروه هیدروالکلی ۳۶/۴ درصد و در گروه گلوکانتیم ۶۵/۵ درصد از بیماران بهبود کامل یافتند(۲۱). مطالعه موون و همکاران(۲۰۰۶) به خوبی ثابت کرد که غلظت های پایین اسانس روغنی *L. angustifolia* و *L. intermedia* می‌تواند به طور کامل *تریکوموناس واژینالیس*، *ژیاردیا دئودنالیس* و *هگزامیتا انفلاتا* را در محیط کشت از بین ببرد. هر دو اسانس روغنی فعالیت ضد انگلی سریع و قدرتمندی در ۱ و ۰/۵ درصد از خود نشان دادند. تفاوت‌های موجود در فعالیت اسانس روغنی در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد بسیار کم بوده و به نظر نمی‌رسد که اهمیت بالینی داشته باشد. در مقابل تفاوت‌های معنی‌داری در غلظت ۰/۱ درصد اسانس روغنی *L. angustifolia* مشاهده شد که نشان

1-Lavandula Viridis
2-Cassia Fistula

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

دهنده‌ی عمل کرد بهتر آن علیه *ژیاردیا دئودنالیس* و *هگزامیتا انفلاتا* است(۲۲). روزا و همکاران(۲۰۰۳) در برزیل تأثیر عصاره روغنی غنی از لینالول اقاقیا[1] علیه *لیشمانیا آمازوننسیس* در غلظت‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی را بررسی نمودند. آنها گزارش کردند که این عصاره روغنی غنی از لینالول اقاقیا در محیط کشت باعث تخریب کروماتین کینتو پلاست، هسته و لیز پرو ماستیگوت‌های *لیشمانیا آمازوننسیس* در محیط کشت شده است(۲۳). خیر اندیش و همکاران(۲۰۱۱)، تأثیر عصاره روغنی مرزه کوهی بر روی ضایعات جلدی لیشمانیازیس را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که ضایعات جلدی محدود شده و میزان مرگ و میر به طور معنی‌داری کاهش یافت که نشان دهنده خاصیت ممانعت کنندگی از مرگ این عصاره بر روی موش‌ها بوده است(۲٤). در مطالعه صورت گرفته به وسیله عبدوالامر و همکاران(۲۰۱۰) بر روی سیاه دانه به اثرات ضد التهابی این گیاه پی برده شد هر چند اثرات ضد لیشمانیازیسی این گیاه مورد بررسی قرار نگرفت (۲۵).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر پس از بررسی نتایج، اثر بخشی اسانس‌های روغنی سیاه دانه و مرزه بر شکل پروماستیگوت لیشمانیا قابل مشاهده است، چرا که تعداد انگل‌های زنده کمتری پس از افزودن اسانس گیاهی در غلظت‌های مختلف نسبت به گروه شاهد قابل مشاهده است. بنابراین با توجه به افزایش مقاومت‌های دارویی به انگل لیشمانیا می‌توان از اسانس‌های گیاهی نظیر مرزه و سیاه دانه به عنوان درمان جایگزین برای از بین بردن لیشمانیازیس استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود، اثر اسانس روغنی مرزه و سیاه دانه بر روی شکل آماستیگوت داخل ماکروفاژ بررسی شود و در صورت اثبات اثر آن بر این شکل انگل، تحقیقات در بدن موجود زنده ادامه یابد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه شهر کرد بود که با حمایت مالی معاونت پژوهشی این دانشگاه انجام شد.

1-Croton cajucara

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

REFRENCES:

1.Alippi A, Ringuelet J, Cerimele E. Antimicrobial activity of some essential oils against paenibacillus larvae, The causal agent of American foodbmod diseases. Journal of Herbs, spices & Medical Plants 1996; 9(4): 16-49.

2.Christensen HA, Fairchild GB, Herrer A. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. Journal of Medical Entomology 1983; 20: 463-84.

3.Meshnick SR. Artemisinin: mechanism of action, resistance and toxicity. International Journal of Parasitology 2002; 32: 1655-60.

4.Ahmadi K, Mahmoudzadeh PA, Esfahani AA. Effect of garlic extract on cutaneous leishmaniasis and the role of nitric oxide. Iranian Journal of Medical Sciences 2002; 27: 97-100.

5.Lezama-Davila CM, Isaac-Marquez A. Immunobiology of leishmaniasis. Autonomous University of Campeche, Mexico 1995.

6.Vande Waa E, Tracy J. Farmacologia. In: Smith C, Reynard A(editors). Medical Panamericana: Argentina; 1993; 875–7.

7.WHO, World Health Organization site. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Available at: www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/urden_magnitude/en/index.html. Accessed May15, 2010.

8.Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. Natural Product Reports 2001; 18: 674-88.

9.Kazemi E, Thalari SA, Hooshyar H. Effects of berberri alcoholic extract on wounds of leishmania major in BALB/c mice. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research 2007; 5: 35-42.

10.Ben Salah A, Zakraoui H, Zaatour A. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1995; 53: 162-6.

11.Berman J, Lee L. Activity of oral drugs against Leishmania tropica in human macrophages in vitro. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1983; 32(5): 947-51.

12.Perrucci S, Marcianti F,CioniP L. In-vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of microsperumcanis and M.gypseum. Planta Medical 1994; 60: 184-7.

13.Herpburn NC. Management of cutaneous leishmaniasis. Current Opinion in Infection Disease 2001; 14: 151-154.

14.Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JG. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that Leishmaniaamazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1991; 44 (5): 536-46.

15.Alborzi A, Namjoian F, Azadbakht M. Effects of Ferulaassa-foetida and its effective fractions on Leishmania (in vitro). Infectous Tropic Disease Iran 2003; 8: 36-40.

16.Yagoobi MR, Hanafibojd AA. Epidemiological studies in a new focus of cutaneous leishmaniosis due to leishmania major in ardestone town. Acta Trop 2001; 79: 115-210.

17.Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A. Artemisinin triggers induction of cell cycle arrest and apoptosis in Leishmaniadonovanipromastigotes. Journal of Medicinal Microbiology 2007; 65: 1213-8.

18.Saldenha AC, Romero GA. Comparative study between sodium stibigluconate and meglumineantimoant in cutaneous leishmaniasis treatment. Journal of Tropical Medicine 2006; 33: 383-8.

19.Rocha LG, Almeida J, Mac do RO. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 2005;12: 514-35.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

20.Machado M, Santoro G, Sousa M. Activity of essential oils on the growth of Leishmania infantum promastigotes. Flavour and Fragrance Journal 2010; 25: 156-60.
21.Jafari F, Moradi S, Nilfroshzadeh M. Comparision effect of concentrated decoction extract and hydroalcoholic fruit extract of Casia fistula with local injection of glucantim on Cutaneous leishmaniasis. Skin Diseases 2006; 9: 211-6.
22.Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against Giardia duodenalis, Trichomonasvaginalis and Hexamitainflata. Parasitology Research 2006; 99: 722-8.
23.Rosa MSS, Mendonça-Filho RR. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003; 47: 1895.
24.Kheirandish F, Delfan B. The effect of Saturejakhuzestanicaessential oil on the lesions induced by Leishmania major in BALB/c mice. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2011; 5: 648-53.
25.Abdul Ameer N, Al-Harchan H. Treatment of acne vulgaris with Nigella Sativa Oil Lotion. Iraqi Postgraduate. Medical Journal 2010; 9(2): 140-144.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 17:25 +0330 on Saturday November 27th 2021

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Essential Oil of *Nigella sativa* and *Satureia hortensis* on Promastigot Stage of *Lishmania major*

Pirali-Kheirabadi Kh[1*], Dehghani-Samani A[2], Adel M[3], Hoseinpour F[4]

[1]Department of Pathobiology, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran,[2] Department of Veterinary medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran,[3] University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, [4]Department of Basic Sciences, University of Shiraz, Shiraz, Iran

Received: 28 Aprl 2013 Accepted: 19 Jun 2013

Abstract

Background & aim: Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by a protozoan parasite of the genus Leishmania. Traditionally, medicinal plants have been used for topical effects of leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate the effect of the essential oil of *Satureia hortensis* and *Nigella sativa* on the Leishmania major.

Methods: In this experimental study, the effects of the plant's essential oils and savory black beans on the Leishmania major form were studied. Evaluation was determined based on the average of Leishmania parasites form survival after exposure to different concentrations of herbs and chemical drugs MA dose at different intervals. For this purpose, different extracts with ratios of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, and 2% were added. Different groups of this study were kept in the same condition (incubated at 26 ° C). The parasites were removed from the incubator and the numbers of viable parasites were counted after 24hours. Data were analyzed using descriptive statistics, Tukey test and GM.

Results: There was a significant difference in reducing parasites on groups receiving *Satureia hortensis* and *Nigella sativa* with Glucantime ($p < 0.05$).

Conclusion: Due to the increasing drug resistance of Leishmania, plant oils such as *Satureia hortensis* and *Nigella sativa* could be used as an alternative treatment for controlling leishmaniasis.

Key words: Essential oil, Leishmaniasis, *Nigella sativa*, *Satureia hortensis*

[*]**Corresponding Auther: Dr. Khodadad Pirali Kheirabadi,** Shahrekord, Department of Pathobiology, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
Email: khpirali@yahoo.com