بررسی اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی برگ‌های گیاه یونجه سیاه (*Medicago lupulina*) بر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در شرایط آزمایشگاهی به روش MTT و میکروسکوپی و تعیین ترکیبات موجود در آن به روش GC/MS

الهام قریروند اسکندری[۱]، منیر دودی[۲*]، پریسا شعاعی[۳]، شروین غفاری[۳]، مجید یاران[۳]

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲- دکترا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۳- دکترا، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری صدیقه طاهره، اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران
* آدرس مکاتبه: اصفهان، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، کدپستی: ۱۵۵/۸۴۵۱۵
تلفن: ۰۹۱۳۱۲۳۰۴۳۳، نمابر: ۳۳۱۲۰۱۳۶ (۰۳۱)
پست الکترونیک: monirdoudi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۹ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۲/۶

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.

هدف: گیاهان طبی سنتی مانند یونجه سیاه، می‌تواند یک منبع ارزشمند از عوامل دارویی جدید علیه لیشمانیوز باشد.

روش بررسی: عصاره الکلی به روش ماسراسیون آماده شد. پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور ابتدا در محیط کشت اشنایدر و در نهایت در فاز ثابت در محیط کشت RPMI- 1640 کشت داده شدند. سپس با استفاده از روش MTT (Methyl Thiazole Tetrazolium)، مقدار IC50 (Inhibitory Concentrations 50%) برای عصاره و گلوکانتیم تعیین شد. تست MTT برای هر نمونه، ۳ بار تکرار شد.

نتایج: IC50 برای عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۶۵، ۹۸ و ۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای داروی گلوکانتیم نیز برابر با ۲۷، ۱۲ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بین IC50 عصاره و داروی گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری وجود داشت ($P< ۰/۰۵$). تغییرات مرفولوژی پس از مواجه با گلوکانتیم و عصاره الکلی شامل چروکیدگی سلولی، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم و کوچک تر شدن سلول‌ها بود. وجود آلکالوئیدها و فلاوونوئیدها نیز در عصاره الکلی به اثبات رسید.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که عصاره الکلی گیاه مورد آزمون دارای اثرات ضد لیشمانیایی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی بود ولی لزوم انجام آزمایش‌های بیشتر برای ارزیابی اثر آن روی این انگل در مدل حیوانی نیز احساس می‌شود.

گل‌واژگان: یونجه سیاه، گلوکانتیم، لیشمانیوز، لیشمانیا ماژور، MTT

مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری عفونی است که توسط گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود. مردم بسیاری در برخی از کشورها بویژه کشورهای در حال توسعه، به این بیماری مبتلا هستند. لیشمانیوز را می‌توان از لحاظ بالینی به چهار دسته لیشمانیوز جلدی، جلدی- مخاطی، منتشره و احشایی تقسیم کرد که فرم جلدی آن شایع‌تر بوده و در برخی از کشورها از قبیل ایران به وفور یافت می‌شود. گونه‌های مختلف لیشمانیا از طریق گزش پشه فلبوتوموس پاپاتاسی و برخی دیگر از گونه‌های فلبوتوم و لوتزومیا انتقال می‌یابند [۱].

این بیماری دارای اشکال متنوعی است که گوناگونی آن به تنوع گونه‌ها، نوع چرخه مربوط به مخازن حیوانی و پاسخ ایمنی فرد مبتلا که به عوامل ژنتیکی بستگی دارد مربوط می‌شود. دوره کمون لیشمانیوز پوستی دنیای قدیم از ۲ هفته تا چند ماه و در برخی موارد تا چندین سال متغیر است. معمولاً یک ضایعه در ابتدا به شکل یک ندول در ناحیه گزش پشه آلوده ایجاد می‌شود. در مرکز ضایعه به تدریج لایه‌ای خشک ایجاد می‌شود که ممکن است کنده شود و منجر به ایجاد زخمی در ناحیه مرکزی ضایعه شود. در پایان دوره بیماری ضایعه با به جا گذاشتن جوشگاه، تغییر رنگ یافته و بهبود می‌یابد. این بیماری به طور طبیعی توسط سه گونه لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اتیوپیکا ایجاد می‌شود، اما گاهی لیشمانیا دونووانی و لیشمانیا اینفانتوم نیز تولید لیشمانیوز پوستی می‌کنند [۲، ۱].

گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی حاکی از به خطر افتادن قریب به ۳۵۰ میلیون نفر از مردم در ۸۸ کشور مختلف دنیا توسط این بیماری می‌باشد. تعداد مبتلایان به این بیماری در حال حاضر، ۱۲ میلیون نفر بوده و تخمین زده می‌شود که سالانه حدود ۲ - ۱ میلیون مورد ابتلای جدید نیز اتفاق می‌افتد. حدود ۹۰ درصد از موارد ابتلا به لیشمانیوز جلدی در کشورهای افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه بوده است. میزان آلودگی در ایران حدود ۱۶۰۰۰ نفر است اما میزان واقعی آن بیش از ۳ برابر آمار گزارش شده می‌باشد [۳].

لیشمانیوز جلدی از زمان‌های دور در ایران وجود داشته و امروزه کشور ما یکی از کانون‌های مهم این بیماری در جهان محسوب می‌شود. 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 ZCL خوانده می‌شود. لیشمانیوز جلدی شهری به انسان دوست معروف است و ACL نام دارد. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی لیشمانیا ماژور و عامل لیشمانیوز جلدی شهری لیشمانیا تروپیکا می‌باشد. 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 [۵، ۴].

در سطح خاورمیانه نیز می‌توان گفت که از میان ۲۲ کشور منطقه، ۱۴ کشور درگیر لیشمانیوز می‌باشند. کانون‌های روستایی لیشمانیوز جلدی در افغانستان، مصر، ایران، عراق، اردن، لیبی، مراکش، فلسطین، پاکستان، عربستان سعودی، سوریه و یمن وجود دارد و سالک نوع شهری در کشورهای افغانستان، ایران، عراق، مراکش، پاکستان، عربستان سعودی، سوریه، و یمن به چشم می‌خورد. گونه‌ای از انگل لیشمانیا که در ایران باعث لیشمانیوز احشایی می‌شود، لیشمانیا اینفانتوم از مجموعه لیشمانیا دونووانی می‌باشد. در ۱۰ سال اخیر لیشمانیوز احشایی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های اندمیک در قسمت شمال غربی ایران شناخته شده است [۷، ۶].

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 واکسنی مؤثر علیه لیشمانیوز را توجیه می‌کند. دستیابی به واکسنی مؤثر به دلایل متعدد از جمله مصونیت مادام‌العمر بعد از بهبودی زخم سالک و کاربرد لیشمانیزاسیون به منظور پیشگیری از سالک میسر است [۷].

تاکنون واکسن مؤثر و مطمئنی برای این بیماری ساخته نشده است و مبارزه با این بیماری همواره در برنامه‌ریزی‌های ملی کشور

ما مورد توجه بوده و علی‌رغم سرمایه گذاری‌های ملی و بین‌المللی نه تنها این بیماری ریشه کن نشده، بلکه همواره با نمایان شدن کانون‌های جدید بیماری در گوشه و کنار کشور شیوع بیشتری پیدا می‌کند. این بیماری به عنوان یک مشکل اساسی بخش مهمی از فعالیت‌های بهداشتی و اجتماعی را به خود جلب نموده و با ایجاد مشکلات اقتصادی، اجتماعی و روانی خسارات جبران‌ناپذیری را بر اجتماع وارد می‌نماید. در برنامه ملی کنترل سالک به لزوم تعیین خصوصیات اپیدمیولوژیک بیماری در کانون‌های بیماری تأکید شده است. همچنین، جهت انتخاب روش مناسب مبارزه با بیماری‌ها و افزایش موفقیت در برنامه‌های کنترلی نیاز به تعیین خصوصیات اپیدمیولوژیک بیماری در کانون‌های بیماری می‌باشد [۸].

اگر فردی در طول عمر خود به سالک پوستی خشک یا لیشمانیوز شهری مبتلا شود تا آخر عمر به لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور مبتلا نمی‌شود، همچنین اگر به سالک پوستی مرطوب یا لیشمانیوز روستایی مبتلا شود، تا آخر عمر به لیشمانیا تروپیکا مبتلا نمی‌شود و مصونیت دائم و کامل کسب می‌نماید [۹].

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 می‌باشد، 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 می شوند 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، پاروموماییسین 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 شان حتی بعد از اصلاح میزان دوز و درمان طولانی مدت از جمله نقایص آنها می‌باشد. از طرفی این درمان‌ها بویژه در مناطق روستایی به خاطر هزینه سنگین و عدم دسترسی به آن مناسب نمی‌باشد [۱۰].

تحقیقات اخیر بر 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 [۱۱]. گیاهانی که دارای فلاوونوئید، آلکالوئید و ترپنوئید هستند، خاصیت ضدالتهابی دارند [۱۲].

از جمله داروهای ضدلیشمانیایی که منشأ دارویی دارد، می‌توان به آرتمیزینین اشاره کرد. آرتمیزینین یک ترپن لاکتون جدا شده از گیاه درمنه آنوا است که به عنوان داروی ضدمالاریا و ضدلیشمانیا شناخته شده است. این دارو در شرایط آزمایشگاهی با تغییر در متابولیت‌های مربوط به چرخه‌های متابولیسمی مختلف از جمله مسیر متابولیسمی گالاکتوز، مسیر بیوسنتز اسفنگولیپید و هم چنین مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین منجر به توقف فعالیت انگل لیشمانیا ماژور سویه فردلین شده است [۱۳].

در مطالعه‌ای اثر عصاره‌های متانولی گیاهان ترخون و بابونه بر لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده شده بود. عصاره‌های ذکر شده در غلظت‌های مختلف دارای فعالیت ضدلیشمانیایی قابل توجهی بودند [۱۴].

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. 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 عصاره این گیاه به عنوان عاملی علیه لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود [۱۵].

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 IC50 پس از ۲۴ ساعت در عصاره الکلی و آبی به ترتیب ۱۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد [۱۶].

سودی و همکاران تأثیر ضدلیشمانیایی عصاره ریشه گیاه *اچیناسه آ پورپوره آ* (*Echinacea purpurea*) کشت شده در ایران را بررسی کردند و نتایج حاصل را این گونه اعلام داشتند که عصاره ریشه گیاه اثر لیشمانیاکشی غیر قابل برگشت بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی داشت و می‌توانست غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آن را برای پژوهش‌های بالینی مورد استفاده قرار داد [۱۷].

گریکو (Grecco) و همکاران از برگ‌های گیاه باچاری استرتوسا (*Bacchari sretusa*) دو فلاوونوئید به نام‌های ساکورانتین و نریژنین استخراج کردند و این دو ترکیب را در شرایط آزمایشگاهی علیه پروماستیگوت‌های گونه‌های مختلف لیشمانیا آزمودند. در پایان، ترکیب دوم دارای فعالیت علیه لیشمانیا آمازوننسیس، لیشمانیا برازیلینسیس، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا شاگاسی با IC50 بین ۴۳ و ۵۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و ترکیب اول علی‌رغم داشتن شباهت شیمیایی، فعالیت ضدانگلی نشان نداد [۱۸].

اگتو (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. IC50 برای عصاره‌های آبی و متانولیک به ترتیب برابر با ۲۷۹/۴۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴۲/۸۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۱۹].

در این پژوهش نیز اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی برگ‌های گیاه یونجه سیاه بر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) به روش MTT مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

بالوچ (Baloch) و همکاران در آزمونی تأثیرات ضدمیکروبی، حشره‌کشی، ضدتوموری 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 ضدباکتریایی بر ضداستافیلوکوکوس آرئوس با روش چاهک پلیت با قطر هاله‌ای برابر با (میلی‌متر ۲۹/۰۲±۱۸/۰) در حالی که فراکسیون کلروفرم فعالیت قوی‌تری را نشان داده بود و قطر هاله‌ای برابر با (میلی‌متر ۲۶/۰۲±۰۴/۰) در برابر همین باکتری از خود نشان داد. عصاره متانولی علیه قارچ‌های کاندیدا آلبیکانس و کاندیدا گلابراتا فعالیت ضدقارچی با قطر هاله‌ای برابر با (میلی‌متر ۳۶/۰۲±۲/۰) و (میلی‌متر ۴۲/۱۶±۰۹/۰) از خود نشان داد. فراکسیون کلروفرم فعالیت خوبی علیه کاندیدا گلابراتا با قطر هاله‌ای برابر با (میلی‌متر ۳۲/۰۳±۰۹/۰) از خود نشان داد. عصاره متانولی فعالیت کشندگی قوی ضدحشره‌ای علیه حشره تریبولیم کاستانئوم به میزان ۸۶ درصد و علیه حشره ریزوپرتا دومینیکا 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 فوق‌العاده ضدتوموری به میزان ۴۰/۸۹ درصد از خود نشان داد. به علاوه برآورد فیتوشیمیایی عصاره‌ها نشان داد که این گیاه دارای فلاونوئید، آلکالوئید، فنول، تانین و دی‌ترپن‌ها می‌باشد [۲۰].

شکل شماره ۱- تصویری از گیاه یونجه سیاه در فصل بهار بعد از گلدهی

مواد و روش‌ها

این مطالعه که به صورت تجربی و آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری صدیقه طاهره اصفهان به انجام رسیده است، اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه را بر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) به روش MTT، مورد بررسی و ارزیابی قرار داده 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 شد.

برگ‌ها در شرایط استریل و زیر هود از این گیاه جدا و جمع‌آوری شد 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 شد و عصاره الکلی آن مطابق روش خیساندن (ماسراسیون) با استفاده از ۵۰ سی سی اتانول ۸۰ درصد به دست آمد.

سویه استاندارد انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان تهیه شد. در آزمایشگاه مقدار کمی از آن به یک فلاسک حاوی ۳ سی‌سی محیط کشت اشنایدر، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۵ میکرولیتر از استوک پن- استرپ 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. طبق مفاد پروتوکل، می‌توان گفت محیط کشت اشنایدر، یک محیط کشت اختصاصی و فرموله برای کشت سلول‌ها و بافت‌های دروزوفیلا ملانوگاستر در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. این محیط با کد تولید IM003، همراه با ال- گلوتامین و فاقد کلسیم کلراید و سدیم بی‌کربنات است. بنابراین باید این دو ماده در حین آماده‌سازی محیط، به آن اضافه شوند. همچنین این محیط پایه برای تکمیل شدن نیاز به ۲۰ - ۵ درصد سرم جنین گاوی که در اثر حرارت غیرفعال شده است، دارد. سرم جنین گاوی غیرفعال شده فاکتورهای لازم برای رشد را در اختیار سلول‌های حشره قرار می‌دهد. این محیط به شدت مغذی است که می‌تواند رشد سریع سلول‌های مشتق شده از دروزوفیلا را پشتیبانی کند. همچنین این محیط می‌تواند جهت کشت خطوط سلولی مشتق شده از سایر گونه‌های حشرات دوبال استفاده شود. البته این محیط می‌تواند برای کشت سلول‌های دیگر مانند انگل لیشمانیا مورد استفاده قرار گیرد.

سپس از محیط اشنایدر حاوی انگل، لام تهیه شد تا میزان رشد انگل مشاهده شود. با استفاده از میکروسکوپ نوری در نور کم پروماستیگوت‌های متحرک مشاهده شد. 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 انتقال یابند.

نگهداری انگل

به منظور حفظ سویه انگل و ممانعت از تضعیف انگل در اثر پاساژهای متعدد در محیط کشت و صرفه‌جویی در هزینه و وقت می‌توان اشکال پروماستیگوت انگل را در حالت انجماد (کرایو) نگهداری کرد.

مواد و وسایل لازم برای کرایوی انگل:

۱. محیط کشت RPMI - 1640
۲. سرم جنین گاو
۳. گلیسیرول یا DMSO
۴. انگل در اواسط فاز لگاریتمی رشد
۵. آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین
۶. لوله‌های مخصوص انجماد که مقاوم به شوک حرارتی استریل هستند (کرایوتیوب)
۷. لوله فالکون استریل برای سانتریفیوژ
۸. فریزرهای ۲۰- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد
۹. هود بیولوژیک

نگهداری انگل لیشمانیا در درجه حرارت‌های پایین مانند ۷۶- درجه سانتی‌گراد در CO_2 و یا نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد می‌تواند انجام پذیرد.

برای این هدف تعداد یک میلیون انگل در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت درون لوله استریل کافی است. بهتر است انگل در فاز لگاریتمی باشد.

جهت انجام این پژوهش ابتدا گلیسیرول استریل شده به وسیله اتوکلاو با غلظت نهایی ۱۰ – ۷/۵ درصد و یا DMSO استریل شده با فیلتر، با غلظت نهایی ۷ – ۵/۵ درصد به عنوان مایع حافظ انجماد به محیط حاوی انگل افزوده و خوب تکان می‌دهیم. باید توجه کرد حجم لوله‌های انجماد بیش از دو سوم آن پر نشود.

نحوه منجمد کردن انگل لیشمانیا

ویال حاوی انگل به ترتیب طی زمان‌های زیر در درجه حرارت‌های نام برده نگهداری می‌شود:

۱. ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد
۲. ۲۴ ساعت بعد در ۲۰- درجه سانتی‌گراد
۳. ۲۴ ساعت بعد در ۷۰- درجه سانتی‌گراد
۴. در نهایت در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد و یا CO_2 با دمای ۷۶- درجه سانتی‌گراد

نحوه ذوب کردن ویال حاوی انگل لیشمانیا

ذوب کردن ویال حاوی انگل در بن ماری ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت می‌گیرد، سپس به منظور کاهش اثر سمی DMSO و یا گلیسرین برای سلول‌ها، انگل‌های ذوب شده را بلافاصله با محیط RPMI- 1640 رقیق کرده و زیر میکروسکوپ مشاهده می‌کنیم. حرکت انگل‌ها نمودار خوبی از زنده بودن آنهاست. گرچه پروماستیگوت‌های بدون حرکت هم ممکن است در محیط کشت رشد پیدا کنند.

عصاره الکلی خشک شده در دمای معمولی، با استفاده از ۲ سی‌سی آب مقطر استریل و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO رقیق‌سازی شد. از DMSO به عنوان 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.

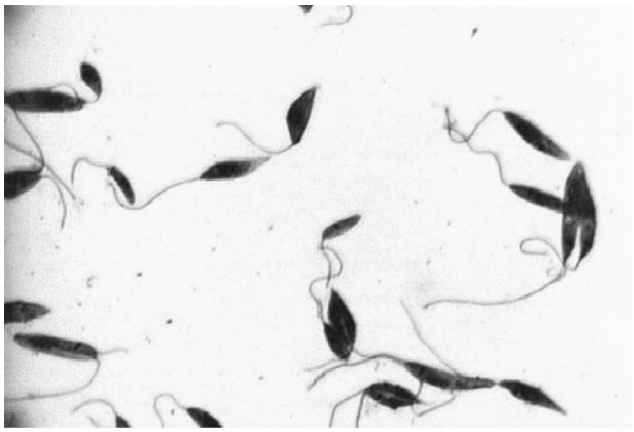
داروی گلوکانتیم یکی از بهترین داروهای رفرانس جهت از بین بردن این انگل می‌باشد که ابتدا مقدار لازم از آن در بافر فسفات (PBS) حل شد، سپس با استفاده از محیط RPMI- 1640 در اپندورف‌های مربوطه به روش تهیه سریال رقت، این دارو رقیق‌سازی شد. ۵ رقت ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵

میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و سپس رقت‌های عصاره الکلی و گلوکانتیم از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا استریل شوند.

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 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) 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 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 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 در طول موج ۶۳۰ -۵۴۰ نانومتر بررسی شد.

جهت ارزیابی تغییرات مرفولوژیک پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) ابتدا سلول‌های پروماستیگوت این انگل به کمک دستگاه سانتریفیوژ در دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شده و ماده رویی به آرامی جدا شد 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 x ۱۰۰ مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

جهت تعیین ترکیبات موجود در عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در این پژوهش، از دستگاه GC/MS شامل ردیاب جرمی Aglient 5975 C با منبع یونیزاسیون الکترونی (EI) کوپل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Aglient 7890 که از 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 شد.



شکل شماره ۲- پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت و یا داخل بدن میزبان بی‌مهره (پشه خاکی) [۲۵]

نتایج

نتایج بررسی اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی 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 استاندارد تحت شرایط In vitro به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار شماره ۱ ارائه شده است.

با توجه به نمودار شماره ۱، IC50 برای عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۶۵، ۹۸ و ۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

از داروی گلوکانتیم نیز به عنوان گروه کنترل جهت مقایسه اثر بخشی عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد تحت شرایط In vitro، به ۱روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد که نتایج در نمودار شماره ۲ ارائه شده است.

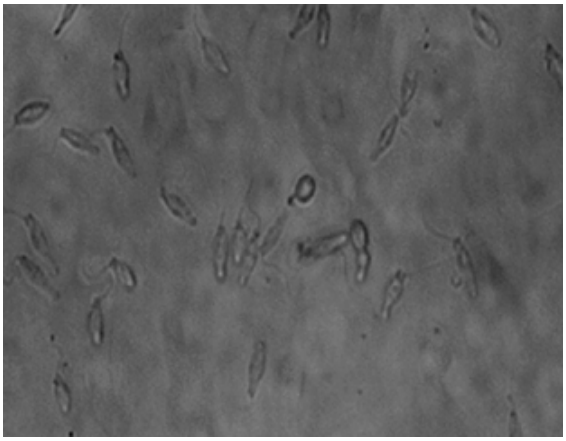
نتیجه بررسی تغییرات مرفولوژیک و پرولیفراسیون پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد (MRHO/IR/75/ER) در اثر مواجهه با غلظت‌های مختلف گلوکانتیم و عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در شرایط آزمایشگاهی به شرح زیر بود:

در این مرحله سلول‌های انگل لیشمانیا ماژور استاندارد در مواجه با غلظتی از گلوکانتیم و عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه که به عنوان 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.

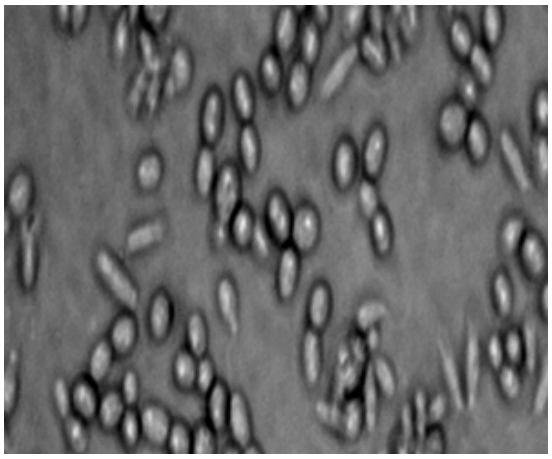
این تغییرات پس از مواجه با گلوکانتیم و عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه آغاز شد و شامل چروکیدگی سلولی، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم و کوچک‌تر شدن سلول‌ها بود. هیچ‌گونه تغییری در سلول‌های کنترل مشاهده نشد.

نمودار شماره ۱- محاسبه IC50 عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه با استفاده از نتایج به دست آمده حاصل از اثر غلظت‌های مختلف آن بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد 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)

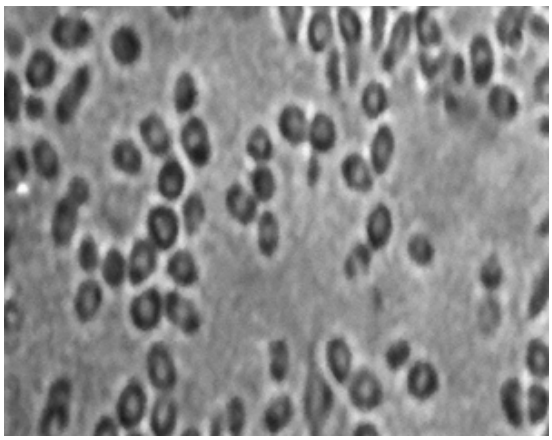
نمودار شماره ۲- محاسبه IC50 داروی گلوکانتیم، به عنوان گروه کنترل بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد در محیط In vitro، به روش MTT بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (نمودار آبی رنگ: ۲۴ ساعت، نمودار قرمز رنگ: ۴۸ ساعت، نمودار خاکستری رنگ: ۷۲ ساعت)



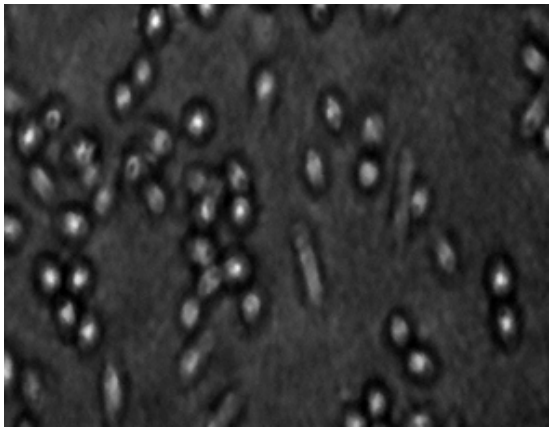
شکل شماره ۳- مرفولوژی انگل لیشمانیا ماژور سویه استاندارد کنترل بعد از ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد. تغییری در آنها مشاهده نشد.



شکل شماره ۴- مرفولوژی انگل لیشمانیا ماژور سویه استاندارد تیمار شده با عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در ساعت ۲۴ در بزرگ نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد. گرد شدن و کوچک شدن سلول‌ها در تصویر مشهود است. در برابر گلوکانتیم نیز این حالت در پروماستیگوت‌های انگل استاندارد ایجاد شد.



شکل شماره ۵- مرفولوژی انگل لیشمانیا ماژور سویه استاندارد تیمار شده با عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در ساعت ۴۸ در بزرگ نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد. گرد شدن، چروکیدگی و کوچک شدن سلول‌ها در تصویر مشهود است. در برابر گلوکانتیم نیز این حالت در پروماستیگوت‌های انگل استاندارد ایجاد شد.



شکل شماره ۶- مرفولوژی انگل لیشمانیا ماژور سویه استاندارد تیمار شده با عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در ساعت ۷۲ در بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد. گرد شدن، چروکیدگی و کوچک شدن سلول‌ها در تصویر مشهود است. در برابر گلوکانتیم نیز این حالت در پروماستیگوت‌های انگل استاندارد ایجاد شد.

در این قسمت تعداد پروماستیگوت‌های تغییر شکل داده انگل لیشمانیا ماژور سویه استاندارد (MRHO/ER/75/IR) این انگل که تحت تأثیر عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه قرار گرفته بودند، در مقایسه با گلوکانتیم شمارش شده و در جداول زیر ارائه شده است.

درصد پروماستیگوت‌های تغییر شکل داده تحت تأثیر گلوکانتیم در جدول شماره ۱ آورده شده است.

درصد پروماستیگوت‌های تغییر شکل داده تحت تأثیر عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در جدول شماره ۲ آورده شده است

همچنین نتیجه گاز کروماتوگرافی جرمی برای عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

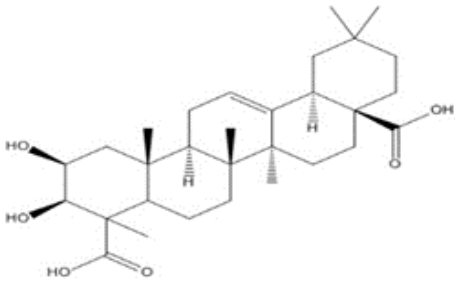
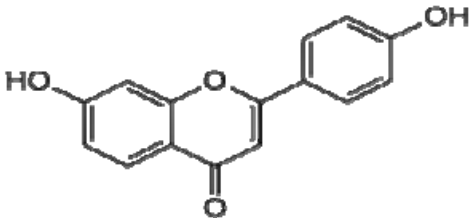
جدول شماره ۱- بررسی مرفولوژیک و پرولیفراسیون پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* استاندارد تحت تأثیر گلوکانتیم

درصد پروماستیگوت‌های تغییر شکل داده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
درصد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد تغییر شکل داده تحت تأثیر ۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر گلوکانتیم	۵۸ درصد	٪ ۸۶	۹۷ درصد

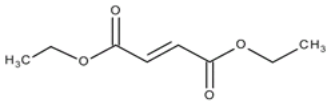
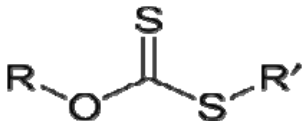
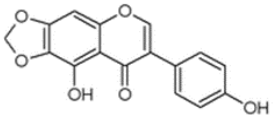
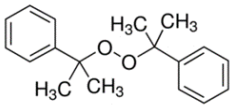
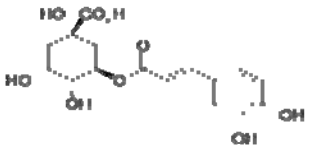
جدول شماره ۲- بررسی مرفولوژیک و پرولیفراسیون پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد تحت تأثیر عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه

درصد پروماستیگوت‌های تغییر شکل داده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
درصد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد تغییر شکل داده تحت تأثیر ۹۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ‌های گیاه یونجه سیاه	۴۲ درصد	۶۸ درصد	۸۹ درصد

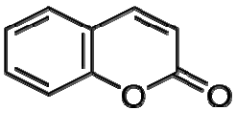
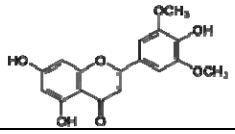
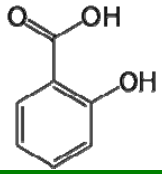
جدول شماره ۳- اجزای تشکیل‌دهنده عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه پس از گاز کروماتوگرافی جرمی

ماده	مقدار (درصد)	مشخصات ماده
اسید مدیکاژنیک (Mediacagenic acid)	۱۳/۱۹ درصد	نام‌گذاری آیوپاک: 2- beta, 3- beta- dihydroxyolean- 12- one-23, 28- dioic acid فرمول مولکولی: $C_{30}H_{46}O_6$ جرم مولکولی: ۵۰۲/۶۸۲۶ گرم بر مول ساختار شیمیایی: 
۷ و۴- دی‌هیدروکسی فلاوون (7,4'-Dihydroxyflavone)	۱۱/۲ درصد	نام‌گذاری آیوپاک: 7- Hydroxy- 2- (4- hydroxyphenyl) chromen- 4- one فرمول مولکولی: $C_{15}H_{10}O_4$ وزن مولکولی:۲۵۴/۲۴ گرم بر مول ساختار شیمیایی: 

ادامه جدول شماره ۳-

ماده	مقدار (درصد)	مشخصات ماده
دی‌اتیل فومارات (Diethyl fumarate)	۹/۰۹ درصد	فرمول مولکولی: $C_8H_{12}O_4$ نام دیگر: فوماریک اسید دی‌اتیل استر نقطه جوش: ۲۱۹ درجه سانتی‌گراد نقطه ذوب: ۲ -۱ درجه سانتی‌گراد ساختار شیمیایی: 
اسید زانتیک (Xanthic acid)	۸/۳ درصد	فرمول مولکولی: $ROCS_2$ شکل ظاهری: مایع بی رنگ و چرب ساختار شیمیایی: 
آیریلون (Irilone)	۷/۱۲ درصد	نام‌گذاری آیوپاک: Hydroxyl- 7- (4- hydroxyphenyl)-9 [13] dioxolo [45-g] chromen- 8- one فرمول مولکولی: $C_{16}H_{10}O_6$ وزن مولکولی: ۲۹۸/۲۴ گرم بر مول ساختار شمیایی: 
دی‌کومیل پروکسید (Dicumyl peroxide)	۶/۱۴ درصد	فرمول مولکولی: $C_{18}H_{22}O_2$ انحلال‌پذیری در آب: نامحلول ساختار شیمیایی: 
کلروژنیک اسید (Chlorogenic acid)	۴/۷۱ درصد	نام‌گذاری آیوپاک: (1S, 3R, 4R, 5R)- 3- {[(2E)- 3- (3, 4-dihydroxyphenyl) prop- 2- enyol] oxy} -1, 4, 5- trihydroxycyclohexanecarboxylic acid فرمول مولکولی: $C_{16}H_8O_9$ وزن مولکولی: ۳۵۴/۳۱ گرم بر مول چگالی: ۱/۲۸ گرم بر سانتی‌متر مکعب دمای ذوب: ۲۰۹ -۲۰۷ درجه سانتی گراد ساختار شیمیایی: 

ادامه جدول شماره ۳-

ماده	مقدار (درصد)	مشخصات ماده
کومارین (Coumarin)	۴/۵ درصد	نام‌گذاری آیوپاک: 2H- chromen- 2- one فرمول مولکولی: $C_9H_6O_2$ جرم مولکولی: ۱۴۶/۱۴ گرم بر مول شکل ظاهری: کریستال سفید فاقد کلر دمای ذوب: ۷۱ درجه سلسیوس دمای جوش: ۳۰۱/۷۱ درجه سانتی گراد ساختار شیمیایی: 
تریسین (Tricin)	۴/۱۶ (درصد)	نام‌گذاری آیوپاک: 5, 7- dihydroxy- 2- (hydroxy- 3, 5-dimethoxyphenyl) -4H- chromen- 4- one فرمول مولکولی: $C_{17}H_{14}O_7$ وزن مولکولی: ۳۳۰/۲۹ گرم بر مول ساختار شیمیایی: 
سالیسیلیک اسید (Salicylic acid)	۳/۰۷ (درصد)	نام‌گذاری آیوپاک: 2- hydroxybenzoic acid فرمول مولکولی: $C_7H_6O_3$ وزن مولکولی: ۱۳۸/۱۲ گرم بر مول چگالی: ۱/۴۴۳ گرم بر سانتی متر مکعب محلول در آب، اتر، CCl_4 شکل ظاهری: کرستال سفید رنگ فاقد کلر ساختار شیمیایی: 

بحث

با توجه به گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی مبنی بر این که لیشمانیوز از خطرناک‌ترین بیماری‌های عفونی می‌باشد و این که داروهای شیمیایی مربوط به این بیماری دارای عوارض جانبی زیادی می‌باشد، اخیراً گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸].

از آنجایی که از گیاه آلوئه ورا در پزشکی استفاده وسیعی می‌شود، در مطالعه‌ای اثربخشی ماده مترشحه از برگ‌های آلوئه‌ورا بر روی لیشمانیوز بررسی شد. پروماستیگوت‌های گونه‌های ایجادکننده لیشمانیوز احشایی، مخاطی و جلدی به برگ آلوئه‌ورا حساس بودند و IC50 عصاره این گیاه از ۱۰۰ تا ۱۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این داده‌ها مشخص کرد که

برگ آلوئه‌ورا از طریق فعالیت مستقیم ضد لیشمانیایی می‌تواند باعث فعالیت بهتر ماکروفاژهای میزبان شود و می‌توان از آن به عنوان یک عامل ضد لیشمانیایی مؤثر در تحقیقات دارویی استفاده کرد [۲۳].

یک گروه تحقیقاتی تأثیر ضد لیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه و داروی کنترل تارتارامتیک را بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به روش MTT در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و نتایج به صورت IC50 برای هر کدام از عصاره‌ها به صورت جداگانه محاسبه شد. IC50 عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه به ترتیب ۵/۹، ۷/۵ و ۳/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان IC50 تارتارامتیک برابر با ۴/۷ میکروگرم بر میلی‌لیترمحاسبه شد. اگر چه عصاره قوزه پنبه نسبت به ۲ عصاره دیگر تأثیر بیشتری روی پروماستیگوت‌ها نشان داد، ولی کلاً همه این عصاره‌ها دارای فعالیت ضد لیشمانیایی بودند [۲۴].

در مطالعه دیگری که صورت گرفت از مناطق مرکزی و غرب بورکینافاسو ۵ گیاه انتخاب شد که این ۵ گیاه به صورت سنتی برای درمان بیماری‌های انگلی و سرطان استفاده می‌شدند. در مطالعات قبلی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدپرولیفراسیون این گیاهان کار شده بود و در این مطالعه عصاره الکلی گیاه برای نشان دادن فعالیت احتمالی ضدلیشمانیایی و ضد تریپوزومیایی آزمایش شد و از روش‌های کلریمتریک و اسپکتروفتومتری برای تعیین این امر استفاده شد که در پایان به این نتیجه رسیدند که عصاره Lantana ukambensis فعالیت ضد لیشمانیایی با IC50 برابر با ۶/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارد [۲۵].

در این تحقیق نیز از میان گیاهانی که دارای مواد مؤثره گیاهی مانند آلکالوئیدها و فلاونوئیدها هستند و همچنین خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدحشره‌ای و ضدتوموری هستند، گیاه یونجه سیاه انتخاب شد و تأثیر عصاره الکلی برگ‌های آن بر رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور مطالعه و بررسی قرار گرفت.

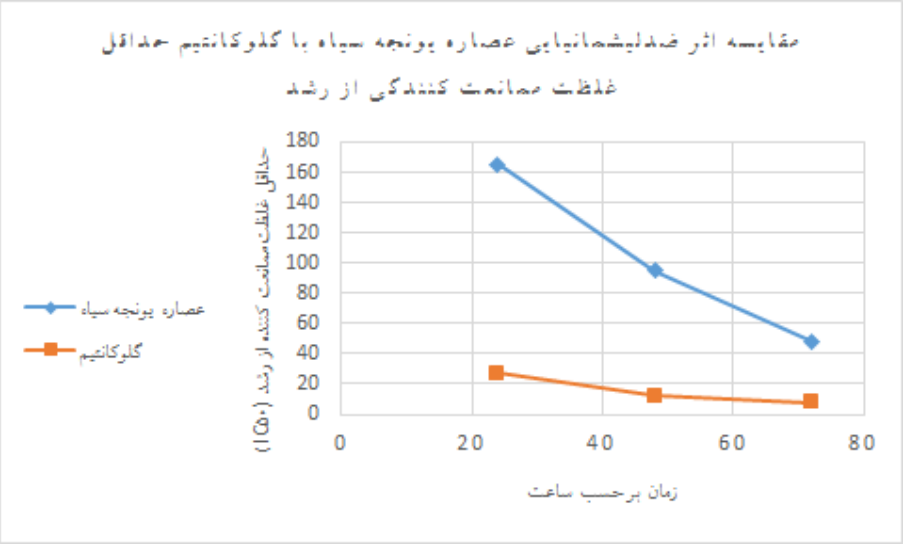
دلیل اصلی انتخاب گیاه یونجه سیاه، این بود که در منطقه فریدن اصفهان از این گیاه به عنوان داروی ضد زخم استفاده می‌شود و در این زمینه گیاهی کم نظیر است و از این حیث در این منطقه شهرت فراوان دارد. در بررسی‌های فیتوشیمیایی نیز مشاهده شد که دارای موادی نظیر فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها و سایر مواد ترمیم‌کننده زخم است، اما تاکنون در بررسی‌های علمی توجه بسیار کمی به آن شده است.

به این امید این گیاه انتخاب شد که اگر خاصیت ضدلیشمانیایی داشته باشد، گیاهی معرفی شود که علاوه بر فعالیت ضد انگلی علیه لیشمانیا ماژور بتواند زخم سالک را نیز ترمیم نماید.

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

طبق نمودار شماره ۲، IC50 برای داروی گلوکانتیم علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استاندارد در محیط آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۲۷، ۱۲ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور نیز در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۶۵، ۹۸ و ۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

در این پژوهش نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره الکلی و گلوکانتیم، اثر مهاری بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور افزایش می‌یافت (نمودارهای شماره ۱ و ۲) و کاهش جذب نوری نشان‌دهنده این اثر مهاری بود. مقایسه میانگین جذب نوری عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه با داروی کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌داد ($P< ۰/۰۵$)، که نشان‌دهنده تأثیر عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در غلظت‌های مختلف بر پروماستیگوت‌های استاندارد لیشمانیا ماژور بود (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳- بررسی اثر ضدلیشمانیایی عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه بر پروماستیگوت‌های استاندارد لیشمانیا ماژور با داروی گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (P<۰/۰۵)

سلول‌های انگل لیشمانیا ماژور استاندارد در مواجه با غلظتی از گلوکانتیم و عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه که به عنوان 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 مواجه با گلوکانتیم و عصاره الکلی آغاز شد و شامل چروکیدگی سلولی، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم و کوچک تر شدن سلول‌ها بود (مطابق با شکل‌های شماره ۲، ۳ و ۴) و هیچ‌گونه تغییری در سلول‌های کنترل مشاهده نشد (مطابق با شکل شماره ۱).

با توجه به نتایج ارائه شده در جداول شماره ۲ و ۳ می‌توان گفت که در مقایسه با گلوکانتیم تعداد سلول‌های تغییر شکل داده مربوط به پروماستیگوت‌هایی که تحت تأثیر عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه قرار گرفته بودند، کمتر بود.

فرم پروماستیگوت انگل را اغلب در محیط‌های کشت N.N.N و RPMI-1640 کشت می‌دهند. محیط کشتی که در این تحقیق به جای محیط کشت N.N.N مورد استفاده قرار گرفت، محیط کشت اشنایدر می‌باشد. 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].

در این مطالعه از محیط کشت اشنایدر و RPMI-1640 برای کشت انگل استفاده شده است که سبب صرفه‌جویی در وقت شد.

همچنین برآورد فیتوشیمیایی عصاره برگ‌های یونجه سیاه توسط بالوچ و همکاران نشان داده بود که دارای فلاونوئید، آلکالوئید، فنول، تانین و دی ترپن‌ها می باشد. در این پژوهش نیز با توجه به جدول شماره ۴، وجود موادی نظیر دی کومیل پروکسید، دی اتیل فومارات، ۷ و ۴- دی هیدروکسی فلاوون، کومارین، اسید مدیکاژنیک، اسید زانتیک، کلروژنیک اسید، سالیسیلیک اسید، آیریلون و تریسین در عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه با استفاده از گازکروماتوگرافی جرمی به اثبات رسید.

نتیجه‌گیری

در این پروژه اثر ضد لیشمانیایی عصاره الکلی برگ‌های یونجه سیاه در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که دارای اثرات ضد لیشمانیایی قابل توجهی می‌باشد. با اینکه اختلاف معنی‌داری بین IC50 عصاره الکلی گیاه و داروی گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد، اما می‌توان گفت با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی، می‌توان این دسته از گیاهان مؤثر را مورد توجه قرار داد.

پیشنهاد

با توجه به این که عصاره الکلی گیاه مورد آزمون دارای اثرات ضد لیشمانیایی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی بود ولی لزوم انجام آزمایشات بیش تر برای ارزیابی اثر آن روی این انگل در مدل حیوانی نیز احساس می شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی بیماری‌های عفونی و گرمسیری صدیقه طاهره اصفهان، مسئول محترم هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و کادر محترم آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان و کلیه عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری رسانده‌اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آوریم.

منابع

1. Mohseni N, Sajjadi S.E, Eskandarian A.A, Yousefi H.A, Mansurian M, Shokoohinia Y and Mohseni N. Natural Anti-Leishmaniasis Compounds in Traditional Iranian Medicine. *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine* 2012; 3 (1): 41 - 50.

2. Bull B, Millon L, Bart L, Gallego M, Gambarelli F, Portús M, Schnur L, Jaffe CL, Fernandez-Barredo S, Alunda JM and Piarroux R. Practical approach for typing strains of Leishmania infantum by microsatellite analysis. *Journal Clinical Microbiol*. 2002; 40: 3391 - 97.

3. en- Ami R, Schnur LF, Golan Y, Jaffe CL, Mardi T, Zeltser D. Cutaneous involvement in a rare case of adult visceral Leishmaniasis in Israel. *Journal Infection* 2002; 44: 181 - 4.

4. Taheri S, Vakili Z and Saffari M. Effect of Different Types of Blood on the Growth of Cutaneus Leishmaniasis Agent in Vitro. *JSSU*. 2007; 14 (4): 69 - 75.

5. Ramezani Y, Mousavi GA, Bahrami A, Fereydooni M, Parsa N and Kazemi B. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Aran and Bidgol city from April to September 2009. *Journal of Kashan University of Medical Sci.* 2011; 15: 254-258.

6. Hashemi N, Hashemi M, Eslami G, Shirani Bidabadi L and Hejazi H. Detection of Leishmania Parasites from Cutaneous Leishmaniasis Patients with Negative Direct Microscopy using NNN and PCR-RFLP. *Journal of Isfahan Medical School* 2012; 29 (169): 2613 - 19.

7. Postigo JA. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *International Journal of Antimicrob Agents* 2010; 36 (1): 62 - 5.

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

9. Modabber F. First generation leishmaniasis vaccine clinical development: moving but what next? *Curr Opin Anti Infect Invest Drug* 2000; 2: 35 - 9.

10. Rafati SN, Khorrami HR. Survey of the diagnostic value of leishmania in skin lesions in patients through direct smear and cuture madia. *Ofoghe Danesh* 2004; 10 (1): 47 - 51.

11. Khosravi A, Sharifi I, Barati M, Zarean M and Hakimi-Parizi M. Anti-leishmanial effect of nanosilver solutions on Leishmania tropica promastigotes by in-vitro assay. *ZJRMS*. 2011; 13 (7): 8 - 12.

12. Chan-Bacab MJ and Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports* 2001; 18 (6): 674 - 88.

13. Bhogireddy N, Naga VKA, Ramesh B, Pradeep KM, Reddy OVS, Gaddaguti V, Raj KK, Pola PK and Venkataraman B. Anti inflammatory and anti-diabetic activities with their other ethnomedicinal properties of the plants. *Journal of*

Medicinal Plant Studies 2013; 1 (5): 87 - 96.

14. Beigi boroujeni M, Arjmand M, Khalili G, Akbari Z, Najafi A, Beigi boroujeni N, Shafiei A and Hajihosseini R. The metabonomic changes of leishmania major, s promastigotes (fredlin strain) after in vitro artemisinin treatment at stationary phase. *Koomesh* 2014; 16 (1): 90 - 6.

15. Sharif M, Ziaei H, Azadbakht M, Daryani A, Ebadattalab A and Rostami M. Effect of methanolic extracts of *Artemisia aucheri* and *Camellia sinensis* on *Leishmania major* (in vitro). *Turkis Journal Medical Sci*. 2006; 36 (6): 365 - 9.

16. Mirzaie M, Nosratabadi SJ, Derakhshanfar A and Sharifi I. 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: 365 - 75.

17. Maspi N, Ghafarifar F, Bahrami AM, Bastaminezhad S and Shamsi M. Evaluation of Leishmanicidal Effect of Watery & Ethanolic Flowers Calendula officinalis Extract on Promastigotes of Leishmania Major (MRHO/IR/75/ER) in Vitro. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sci*. 2010; 18 (1): 28 - 33.

18. Soudi S, Hashemi SM, Zavaran Hosseini A, Ghaemi A and Asghari Jafarabadi M. Antileishmanial Effect of *Echinacea purpurea* Root Extract Cultivated in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Res*. 2006; 6 (2): 147 - 49.

19. Grecco sdos S, Reimao JQ, Tem pone AG, Sartorelli P, Cunha RL, Romoff F, Ferreira MJ, Favero OA and Lago JH. In vitro anti leishmanial and anti trypanosomal activities on flavones from baccharis retusa dc (asteraceac). *Experimental Parasitol*. 2012; 130 (2): 141 - 5.

20. Ogeto T.K, Odhiambo R.A, Shivairo R.S, Muleke C.I, Osero B.O, Anjili C, Ingonga J.M and Osuga I.M. Antileishmanial activity of *Aloe secandiflora* plant extracts against *Leishmnia major*. *Advances in Life Science and Technol*. 2013; 13: 2224 - 81.

21. Baloch N, Nabi S and Al Kahraman Yasser MSA. In vitro antimicrobial, insecticidal, antitumor activities and their phytochemical estimation of methanolic extract and its fractions of *Medicago lupulina* leaves. *World Applied J*. 2013; 23 (4): 500 - 6.

22. UI Bari A and Ber Rahman S. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. *Journal of Association of Dermatologists* 2008; 18: 18 - 42.

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

24. Barati M, Sharifi I and Sharififar F. In vitro Evaluation of Anti-Leishmanial Activities of *Zataria multiflora Boiss*, *Peganum harmala* and *Myrtus communis* by Colorimetric Assay. *Journal of Kerman University of Medical Sci*. 2010; 17 (1): 32 - 41.

25. Sawadogo WR, Le douaron G, Maciuk A, Bories C, Loiseau PM, Figadère B, Guissou IP and Nacoulma OG. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of medicinal plants From Burkina Faso. *Parasitology Res*. 2012; 110 (5): 1779 - 83.

Evalution of Antileishmanial Activity of the Hydroalcohlic Extract of *Medicago Lupulina'* Leaves Against *Leishmania Major (MHOM/IR/75/ER)* Promastigotes by Using MTT and Microscopy Method and GC/MS for Hydroalcohlic Extract of this Plant' Leaves

Gharirvand Eskandari E (M.Sc.)[1], Doudi M (Ph.D.)[1*], Shoaei P (Ph.D.)[2], Ghaffari Sh (Ph.D.)[2], Yaran M (Ph.D.)[2]

1- Islamic Azad University of Falavarjan, Isfahan, Iran
2- Infectius and Tropical Diseases Research Center of Sedigeh Tahereh , Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
*Corresponding author: Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran
Tel & Fax: +98-031-37432601
E-mail: Monirdoudi@yahoo.com, Doudi@iaufala.ac.ir

Abstract

Background: Leishmaniasis, has created enormous global health problem. Side effects, drug resistance and the lack of effective vaccines and to make the new compounds effective due to plant.

Objective: The traditional medical plants such as black alfalfa can be a valuable source of new pharmaceutical agents against leishmaniasis.

Methods: Alcoholic extracts were prepared by maceration method. L. major promastigotes (Leishmania major) in Schneider and then were cultured in RPMI- 1640. Then, using MTT (Methyl Thiazole Tetrazolium), the IC50 (Inhibitory Concentrations 50%) for extract and Glucantime was determined. MTT assay did for each sample, 3 times.

Results: IC50 for alcoholic extract of alfalfa black against L. major promastigotes in vitro after 24, 48 and 72 hours, respectively 165, 98 and 45 micrograms per ml and for Glucantime also equal to 27, 12 and 8 mg l respectively. IC50 between Extract and Glucantime after 24, 48 and 72 hours there was a significant difference (P <0.05). Morphological changes after challenge with meglumine and alcoholic extracts including cell shrinkage, round, dense cytoplasm and the cell was smaller. Presence of alkaloids and flavonoids in alcoholic extracts have been proved.

Conclusion: As regards, plant extract had anti- leishmanial effects in vitro, further works are required to appraise the exact effect on *Leishmania* agent in animal models.

Keywords: ***Leishmania major, Medicago lupulina,*** **Glucantim, Leishmaniases, MTT formazan**