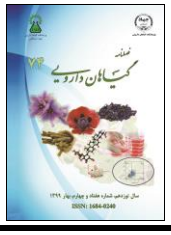
فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۹۹؛ ۱۹(۷۴): ۲۳۹-۲۵۴



فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

مقاله تحقیقاتی

بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی زغال اخته بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط *in vitro* و زخم‌های ناشی از آن در موش‌های Balb/c

حمیدرضا مردانی[۱]، رحمان عبدی‌زاده[۱]، زهرا لری گوئینی[۲]، بهمن خلیلی[۱،*]

[۱] گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲] مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
زغال اخته
لیشمانیا ماژور
لیشمانیازیس

چکیده

مقدمه: آنتی‌موان پنج ظرفیتی ضد لیشمانیازیس مشکلات بازگشت بیماری، مقاومت دارویی، عوارض دارویی و دوره درمان طولانی‌مدت دارند. لذا پژوهش در مورد داروهای جدید بویژه ترکیبات گیاهی بدون عوارض جانبی ضروری می‌باشد. **هدف:** مطالعه حاضر با بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی زغال اخته بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی و زخم ناشی از آن در موش Balb/c انجام پذیرفت. **روش بررسی:** رقت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه زغال اخته به روش ماسراسیون تهیه شد. محیط کشت RPMI حاوی ۵×۱۰^{۵} پروماستیگوت لیشمانیا ماژور به پلیت‌های کشت ۹۶ خانه اضافه شد و عصاره با غلظت‌های مختلف اضافه شد. محلول MTT اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. ۶۰ سر موش Balb/c پس از تلقیح پروماستیگوت لیشمانیا ماژور، در قاعده دم و ایجاد ضایعه لیشمانیوز، غلظت‌های مختلف عصاره، به صورت یک روز در میان به مدت ۳۰ روز به گروه‌های آزمون تزریق شد. قطر زخم‌ها و بار انگلی، قبل و پس از درمان در تمام گروه‌ها تعیین و نتایج ثبت شد و با نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. **نتایج:** یافته‌ها نشان داد که اثر عصاره زغال اخته بر ممانعت‌کنندگی رشد انگل، به دوز و زمان تیمار وابسته است و همه غلظت‌های عصاره توانستند باعث کاهش قطر زخم و کاهش بار انگلی شوند. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که عصاره تأثیر بالایی را در ممانعت از رشد پروماستیگوت در شرایط آزمایشگاهی و حیوانی دارد و توصیه می‌شود در آینده تأثیر پماد و ژل گیاهان مذکور بر لیشمانیوز جلدی مورد بررسی قرار گیرد.

مخففها: SPSS، Statistical Package for the Social Sciences؛ MTT، 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide؛ RPMI، Roswell Park Memorial Institute

* نویسنده مسؤول: nkhalili@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۵ شهریور ۱۳۹۷؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۲۶ دی ۱۳۹۷؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۷ اردیبهشت ۱۳۹۸

doi: 10.29252/jmp.19.74.239

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]

[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

۱. مقدمه

لیشمانیوزیس در ۹۸ کشور مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان اندمیک است و جزء ۶ بیماری عفونی انگلی مهم در جهان بوده که به عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی سراسر جهان می‌باشد و سالانه منجر به زیان‌های اقتصادی و جانی فراوانی می‌شود. تخمین زده شده که حدود ۱۲ میلیون نفر در سراسر جهان به آن مبتلا هستند و سالانه ۱/۵ تا ۲ میلیون مورد جدید بیماری گزارش می‌شود [۲، ۱]. این بیماری توسط تک یاخته داخل سلولی از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و از طریق گزش پشه‌های خاکی جنس فلبتوموس و لوتزومیا انتقال می‌یابد و به عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و حیوانات از قبیل سگ‌سانان و جوندگان می‌باشد [۳]. لیشمانیازیس بسته به گونه انگل، چرخه انگل، پاسخ ایمنی و ژنتیک میزبان دارای طیف وسیعی از علائم بالینی می‌باشد و به سه شکل جلدی (سالک)، احشایی (کالاآزار) و جلدی- مخاطی بروز می‌کند. شکل جلدی که شایع‌ترین شکل بیماری است به دو فرم روستایی (زخم مرطوب) و شهری (زخم خشک) دیده می‌شود [۴]. لیشمانیوز جلدی روستایی شایع‌ترین فرم در ایران است که عامل آن لیشمانیا ماژور می‌باشد. بیماری لیشمانیوز جلدی از زمان‌های دور در کشور ایران وجود داشته و در حال حاضر ایران به عنوان یکی از کانون‌های مهم بیماری در جهان است به گونه‌ای که در ۱۱ استان ایران اندمیک است که بالاترین میزان شیوع مربوط به استان‌های خراسان، اصفهان، کرمان و فارس می‌باشد [۵]. این بیماری در طی سال‌های اخیر به علت افزایش جمعیت و مهاجرت به شهرها، جابجایی جمعیت، مواجه افراد غیر ایمن، تخریب شرایط محیطی و اکولوژی پشه‌های خاکی، مقاومت دارویی انگل، سوء تغذیه و همراهی با HIV روبه افزایش می‌باشد [۶]. در حال حاضر جهت درمان لیشمانیوز جلدی ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان، پنتوستام و آمفوتریسین B استفاده می‌شود که با مسائلی از جمله عود بیماری، هزینه بالای درمان، دوره درمان طولانی، مقاومت دارویی و عوارض دارویی از قبیل سمیت کلیوی و قلبی همراه می‌باشد [۸، ۷]. لذا در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای به منظور استفاده از اشکال دارویی جدید از قبیل ترکیبات گیاهی جهت درمان جایگزین لیشمانیوز در راستای کمتر نمودن عوارض جانبی دارو، بهبود سریع‌تر زخم و عدم ایجاد جوشگاه پس از بهبودی زخم همچنین در دسترس و مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی انجام گرفته است [۹]. از گذشته‌های دور تا به امروز جهت درمان زخم‌های لیشمانیایی از برخی ترکیبات گیاهی استفاده می‌شده است و در سال‌های اخیر نیز بسیاری از محققین آثار اسانس و عصاره‌های مختلف گیاهان محلی و بومی مناطق مختلف جهان بر انگل لیشمانیا در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی را ارزیابی نموده‌اند [۱۲-۱۰]. زغال اخته (*Cornus mas*) میوه گوشتی و خوراکی از درختچه‌ای متعلق به خانواده Cornaceae و جزء گیاهان گلدار دولپه‌ای می‌باشد که بومی مناطق معتدل نیمکره شمالی، اروپای مرکزی، جنوبی و قسمت‌هایی از آسیا مانند ترکیه، ارمنستان، قزاقستان و ایران است. در کشور ایران این گیاه به طور طبیعی در نواحی ارسباران (آذربایجان شرقی)، هیر (قزوین) و برخی از نواحی استان‌های زنجان و گیلان می‌روید [۱۵-۱۳]. حدود ۱۷ ترکیب آنتی‌اکسیدان از خانواده گیلاس استخراج شده است که ویتامین‌های C و E و ملاتونین نیز جزء آنها هستند (آنتی اکسیدان‌ها مقاومت بدن در برابر بیماری‌های غیرواگیر را بالا می‌برند و به پیشگیری از صدمه به سلول‌ها و بافت‌های بدن و درنهایت پیشگیری از بیماری‌هایی چون بیماری قلبی، سرطان، دیابت، تصلب شراین، آب‌مروارید، آرتروز و آرتریت کمک بسزایی می‌کنند). آنتی‌اکسیدان‌های زغال اخته شامل ترکیبات بوتیل هیدرو کوانین، هیدروکسی تولوئن بوتیلات و هیدروکسی آنیزول بوتیلات می‌باشند. زغال اخته با داشتن ترکیباتی چون آنتوسیانین‌ها (سیانیدین، مالونیدین، پئونیدین،

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

پلارگونیدین و پتونیدین)، Ursolic acid، اسید تارتاریک، اسید مالیک، اسید گالیک، بیوفلاونوئیدها، ویتامین C و متابولیت ثانویه مانند ایریدید، تانن، triterpenes، lignan استفاده وسیعی در طب سنتی داشته است [۱۶] و خواص ضد میکروبی گسترده‌ای علیه باکتری‌های انتروپاتوژن (سالمونلا اینتریتیدیس، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، هلیکوباکتر، شیگلا سونری، باسیلوس سرئوس و ...) را نشان می‌دهد [۱۹-۱۷]. همچنین در مطالعات متعدد اثر درمانی این میوه در جلوگیری از آترواسکلروز، قند خون، پروفیل‌های چربی و نیز خواص ضدالتهابی، ضدسرطانی، حفاظت‌کنندگی سیستم کبد، کلیه و قلب و عروق بررسی شده است [۱۶]. در بررسی اثر زغال اخته بر میکروارگانیسم‌های انگلی، Anthony و همکاران در سال ۲۰۰۷ تأثیر آنرا بر روی دو تک یاخته روده‌ای ژیاردیا دئودنالیس (*Giardia duodenalis*) و کریپتوسپوریدیوم پاروم (*Cryptosporidium parvum*) در محیط کشت بررسی نموده‌اند و گزارش کردند که عصاره این گیاه احتمالاً به دلیل داشتن ترکیبات پلی‌فنولیک و آنتوسیانین و پاره کردن دیواره کیست و اووسیست می‌تواند بر روی این دو انگل مؤثر باشد [۲۰]. همچنین Grabensteiner و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات عصاره آبی و اتانولی زغال اخته را بر تک یاخته‌های هیستوموناس مله اگریدیس (*Histomonas meleagridis*)، تتراتریکوموناس گالیناروم (*Tetratrichomonas gallinarum*) و بلاستوسیستیس ارزیابی نموده‌اند و گزارش نمودند که عصاره متانولی زغال اخته بر این تک یاخته‌ها دارای اثر ممانعت‌کنندگی رشد می‌باشد [۲۱]. در مطالعه‌ای دیگر بهاروندی و همکاران در سال ۲۰۱۵ تأثیر عصاره متانولی زغال اخته را در مقایسه با داروی مترونیدازول بر روی تریکوموناس واژینالیس (*Trichomonas vaginalis*) در شرایط آزمایشگاه بررسی نموده‌اند و پیشنهاد نمودند که زغال اخته با داشتن ترکیبات پلی فنولیک دارای اثرات ضدانگلی بر تروفوزوئیت‌های تریکوموناس می‌باشد و با افزایش غلظت عصاره و زمان تماس با انگل میزان بقاء انگل و تکثیر آن کاهش می‌یابد [۲۲]. با توجه به وجود ترکیبات بیوشیمیایی مختلف با اثرات درمانی ویژه در میوه زغال اخته، در این مطالعه سعی شد تأثیر عصاره هیدروالکلی میوه مذکور در مقایسه با داروی گلوکانتیم بر انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی و حیوان آزمایشگاهی بررسی شود تا در صورت کسب نتایج مؤثر بتوان از این عصاره جهت کشف و گسترش داروهای جدید ضد لیشمانیوز استفاده نمود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. *تهیه عصاره گیاه زغال اخته*

میوه زغال اخته قرمز، زرد یا ارغوانی ترش مزه و به اندازه زیتون است که در فصل پاییز از مراکز مورد تأیید مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه خریداری شد. تشخیص و تعیین گونه زغال اخته با کد هرباریومی ۲۰۱ در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد و پس از شستشو با آب مقطر به منظور زدودن گرد و غبار و آلودگی‌های احتمالی سطحی در شرایط سایه و دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) خشک شد. عصاره‌گیری به روش خیساندن (ماسراسیون) انجام گرفت بدین‌صورت که میوه‌های زغال اخته در ۵۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۸۰ درصد (شرکت Merk، آلمان) به نسبت ۱ به ۳ خیسانده شد و به مدت ۷۲ ساعت شیک شد. سپس مایع رویی توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد. مایع به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (Heidolph WD 2000, Brinkmann, Canada) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و درنهایت مایع به دست آمده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز خشک شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۹].

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

۲.۲. کشت انگل

سویه استاندارد انگل لیشمانیا ماژور با کد MRHO/75/ER در میکروتیوب ۷۰- درجه سانتی‌گراد از بخش انگل‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. پس از ذوب کردن به محیط دو فازی Novy Mack Neal Nicole (NNN) شرکت (Himedia، هندوستان) انتقال داده شد و در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از رشد و تکثیر پروماستیگوت در فاز مایع و رسیدن به فاز لگاریتمی به محیط کشت RPMI 1640 (Himedia، هندوستان) غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetus bovine serum) (SIGMA، آمریکا) که قبلاً کمپلمان آن در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شده حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ U/Ml) (Himedia، هندوستان)، استرپتومایسین (۱۰۰ U/Ml) (Himedia، هندوستان) منتقل شد تا به مرحله متاسیکلیک یا آلوده‌کننده برای ماکروفاژ برسند. محیط کشت به مدت چهار روز انکوبه شد و رشد انگل‌ها به صورت روزانه با استفاده از میکروسکوپ اینورت کنترل شد. پس از رسیدن پروماستیگوت‌ها به فاز لگاریتمی رشد، تعداد آنها به کمک لام هموسیتومتر شمارش شدند و به میزان ۵×۱۰^{۶}cell/ml تعدیل شدند سپس آنها جهت مطالعات استفاده شدند [۴].

۳.۲. بررسی اثرات ضد لیشمانیای گیاه زغال اخته با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT

روش MTT، یک روش رنگ سنجی است که طی آن نمک تترازولیوم (Tetrazolium salt) به یک محلول رنگی فورمازان نامحلول تبدیل می‌شود. این واکنش احیاء، توسط فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل انجام می‌شود که به عنوان شاخص رشد و زنده بودن پروماستیگوت در برابر پاسخ دارویی به کار می‌رود [۲۳]. برای تهیه محلول MTT مقدار ۵ میلی‌گرم پودر MTT (SIGMA ,آمریکا) در ۱ میلی‌لیتر محلول Phosphate-Buffered Saline (PBS) استریل (شرکت سیناژن، ایران) حل شد و مورد استفاده قرار گرفت. از پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور موجود در محیط کشت RPMI-1640 در فاز ثابت رشد (Stationary phase) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به هر چاهک پلیت اضافه شد به نحوی که در هر چاهک تعداد ۵×۱۰^{۵} پروماستیگوت قرار گرفت. سپس عصاره گیاه زغال اخته در غلظت‌های ۲، ۳، ۶، ۹، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ mg/ml تهیه شد و به میزان ۱۰ میکرولیتر به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد همچنین یک چاهک به عنوان کنترل مثبت (گلوکانتیم= 10 μg/ml) [۲۴])، یک چاهک به عنوان کنترل منفی حاوی پروماستیگوت‌های انگل (بدون تیمار) و یک چاهک حاوی محیط کشت RPMI دارای ۱۰ درصد FBS فاقد انگل به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. پس از سپری شدن زمان‌های مورد بررسی (۰، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار) ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها با فویل آلومینیومی پوشیده شد و به مدت ۴-۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتیگراد انکوبه شدند، سپس پلیت‌ها از انکوباسیون خارج شدند و حجمی معادل محیط کشت اولیه یعنی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Dimethyl sulfoxide (DMSO) (شرکت سیناژن، ایران) به هر چاهک اضافه شد و با سمپلر محیط و سلول‌ها به آرامی مخلوط شد تا احتمالاً دانه‌های رسوبی وجود نداشته باشد و کریستال‌های فورمازان تشکیل شده به رنگ ارغوانی تیره مشاهده شوند و درنهایت جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه خوانشگر الایزا (Eliza reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با فیلتر رفرنس ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. تمامی اعمال فوق سه بار تکرار شد (Triplicate) و میزان IC_{50} (Inhibitory concentrations 50%) یعنی غلظتی از عصاره که از رشد ۵۰ درصد ارگانیسم جلوگیری می‌کند، محاسبه شد

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

بدین‌منظور نتایج حاصل با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

درصد زنده ماندن انگل $=[(A_T-A_B)/A_C-A_B)] \times 100$

در این فرمول A_C جذب نوری نمونه کنترل، A_T جذب نمونه عصاره مورد آزمایش و A_B جذب حاصل از نمونه بدون سلول (بلانک) می‌باشد. [۲۵].

۴.۲. مرحله برون‌تنی (*in vivo*)

در روش *in vivo*، تعداد ۶۰ سر موش ماده نژاد Balb/c با سن ۴ تا ۶ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و به لیشمانیوزیس جلدی آلوده شدند و اثرات عصاره زغال اخته در بهبود زخم‌ها بررسی شد. به منظور تلقیح انگل، سویه استاندارد لیشمانیا ماژور با کد MRHO/IR/75/ER تهیه شد و به محیط کشت RPMI– 1640 غنی شده با ۱۰ درصد FBS انتقال یافت. پس از کشت انبوه انگل و رسیدن به مرحله ایستایی (Stationary phase) ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی تعداد 2×10^6 پروماستیگوت لیشمانیا ماژور به صورت داخل جلدی در قاعده دم موش‌ها تزریق شد. موش‌ها پس از تزریق در داخل قفس مخصوص و شرایط مناسب در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد نگهداری شدند. پس از گذشت ۴ هفته در قاعده دم زخم ایجاد شد (شکل ۱) که پس از تهیه گسترش از محل زخم و یک دقیقه فیکساسیون با الکل متانول (شرکت Merk، آلمان) و ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی با گیمسا در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی X۱۰۰۰ بررسی شدند و با مشاهده اجسام لیشمن، لیشمانیوز جلدی مورد تأیید قرار گرفت. همچنین شدت آلودگی تعیین شد.

موش‌های آلوده با ارزیابی قطر زخم‌های ایجاد شده به طور تصادفی به ۵ گروه به گونه‌ای که اندازه تقریبی زخم‌ها یکسان باشند و بار انگلی یکسانی داشته باشند به شرح زیر گروه‌بندی شده و مورد تیمار قرار گرفتند: گروه دریافت‌کننده غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زغال اخته، گروه دریافت‌کننده غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زغال اخته، گروه دریافت‌کننده گلوگانتیم (۲۰ mg/kg)، گروه شاهد (دریافت‌کننده نرمال سالین) و گروه شاهد (بدون تیمار) [۲۶].

قبل از شروع درمان قطر هر ضایعه توسط کولیس (vernire-caliper) برحسب میلی‌متر اندازگیری و ثبت شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره زغال اخته با غلظت مشخص بر حسب وزن موش، به صورت داخل عضلانی و ۱۰۰ میکرولیتر از همان عصاره با همان غلظت در داخل و اطراف زخم، همچنین در گروه کنترل داروی گلوکانتیم در داخل و اطراف زخم بوسیله سرنگ انسولین، به صورت یک روز در میان به مدت یک ماه تزریق شد. موش‌های گروه شاهد هیچ دارویی دریافت نکردند. در پایان دوره یک ماهه درمان، قطر زخم‌ها اندازگیری و ثبت شد [۲۶]. در پایان هر هفته از زخم‌ها اسمیر تهیه، با گیمسا رنگ‌آمیزی شد و از لحاظ شدت آلودگی (بار انگلی) توسط میکروسکوپ، مورد بررسی قرار گرفتند. درنهایت نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراستار ۲۱ و آمار توصیفی (شامل میانگین و انحراف معیار) و آمار تحلیلی (شامل آزمون‌های t زوجی، آنالیز واریانس، آزمون مقادیر تکراری با آزمون تعقیبی توکی و آزمون پروبیت) تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

شکل ۱. زخم ایجاد شده در موش، چهار هفته پس از تلقیح انگل لیشمانیا ماژور در قاعده دم موش

۳. نتایج

در این مطالعه تجربی- حیوانی نتایج شاخص‌های IC_{50} و F_{90} عصاره هیدروالکلی گیاه زغال اخته بر انگل لیشمانیا ماژور در محیط آزمایشگاهی متعاقب ارزیابی بوسیله آزمون پروبیت نشان می‌دهد که با افزایش زمان مواجه عصاره با انگل، میزان مهارکنندگی و کشندگی انگل افزایش می‌یابد. در گیاه زغال اخته غلظت مهارکنندگی IC_{50} عصاره در زمان‌های صفر، شش، بیست و چهار، چهل و هشت و هفتاد و دو ساعت به ترتیب ۲۰/۳۷، ۲۰/۳۷، ۱۹/۳۳، ۱۷/۶۹ و ۱۶/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است که افزایش زمان تماس عصاره با انگل باعث تأثیر محسوسی در مهارکنندگی نشده است و در مورد شاخص F_{90} در زمان‌های ۰، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۲۰/۲۵، ۱۰۸/۲۸، ۹۶/۲۴، ۸۱/۹۶ و ۷۳/۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (جدول ۱). همچنین در این مطالعه تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زغال اخته در ۲ غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر روی زخم‌های جلدی حاصل از لیشمانیا ماژور در موش‌های Balb/c که ۴ هفته پس از تلقیح ایجاد شده بودند با بررسی اندازه قطر زخم با اندازه‌گیری دو قطر عمود بر هم زخم (قطر کوچک و قطر بزرگ بر حسب میلی‌متر) بوسیله کولیس و محاسبه میانگین آنها در پایان هر هفته در طول درمان یک ماهه در مقایسه با سایر گروه‌ها تعیین شد. در زمان شروع ارزیابی تیمارهای مختلف، انتخاب و گروه‌بندی حیوانات بر اساس قطر زخم انجام گرفت و سعی شد حتی‌المقدور قطر زخم حیوانات هر گروه به یک اندازه باشد اما در زمان صفر میانگین قطر زخم از نظر آماری در گروه‌های کنترل نرمال سالین و کنترل بدون درمان به طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها کمتر است ($P<۰/۰۵$). بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی زغال اخته بر روی قطر زخم در موش Balb/c در طی دوره تیمار در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد که یک هفته پس از مداخله میانگین قطر زخم در گروه دریافت‌کننده زغال اخته با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از سایر گروه‌ها به جز گروه تحت تیمار با زغال اخته با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشتر است ($P<۰/۰۵$) و

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

دو هفته پس از مداخله میانگین قطر زخم در گروه زغال اخته

جدول ۱. شاخص‌های IC_{50} و F_{90} عصاره هیدروالکلی گیاه زغال اخته بر لیشمانیا ماژور در محیط آزمایشگاهی

عصاره	زمان (ساعت)	IC_{50} (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	فاصله اطمینان ۹۵ درصد	F_{90} (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	فاصله اطمینان ۹۵ درصد
	۰	۲۰/۳۷	(۲۴/۵۷ و ۱۶/۰۵)	۱۲۰/۲۵	(۱۳۷/۴۱ و ۱۰۷/۳۰)
	۶	۲۰/۳۷	(۲۴/۸۱ و ۱۵/۸۳)	۱۰۸/۲۸	(۱۲۵/۰۸ و ۹۵/۸۷)
زغال اخته	۲۴	۱۹/۳۳	(۲۳/۳۹ و ۱۵/۱۹)	۹۶/۲۴	(۱۱۰/۲۸ و ۸۵/۷۰)
	۴۸	۱۷/۶۹	(۲۱/۰۶ و ۱۴/۲۶)	۸۱/۹۶	(۹۲/۶۱ و ۷۳/۷۴)
	۷۲	۱۶/۶۶	(۲۰/۱۷ و ۱۳/۰۹)	۷۳/۲۲	(۸۴/۱۲ و ۶۵/۰۸)

۲۰۰ میلی‌گرم به طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها بیشتر است ($P < ۰/۰۱$) و در گروه دریافت‌کننده زغال اخته با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم میانگین قطر زخم از سایر گروه‌ها به جز گروه دریافت‌کننده گلوکانتیم به طور معنی‌داری بیشتر است ($P<۰/۰۱$). همچنین سه هفته پس از مداخله میانگین قطر زخم در گروه دریافت‌کننده زغال اخته با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم به طور معنی‌داری از گروه‌های دریافت‌کننده گلوکانتیم و زغال اخته با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بیشتر است ($P < ۰/۰۰۱$) و در گروه دریافت‌کننده زغال اخته ۴۰۰ میلی‌گرم به جز گروه گلوکانتیم از سایر گروه‌ها کمتر است ($P < ۰/۰۰۱$). درنهایت در هفته چهارم پس از تیمار میانگین قطر زخم در گروه دریافت‌کننده زغال اخته با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۰۱$) همچنین قطر زخم در موش‌های که با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم زغال اخته تحت تیمار بوده‌اند به جز گروه دریافت‌کننده گلوکانتیم به طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها کمتر است ($P < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۱). از سوی دیگر بررسی تعداد مرگ موش‌ها در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که در هفته اول پس از درمان تعداد تلفات در گروه‌های کنترل بدون درمان و کنترل نرمال سالین هر گروه ۲ موش، هفته دوم درمان در گروه کنترل بدون درمان ۱ موش و هفته سوم در گروه دریافت‌کننده نرمال سالین ۱ موش بود. نتایج ارزیابی تأثیر عصاره زغال اخته در شرایط درون‌تنی نشان می‌دهد که در طول درمان با گذشت زمان تفاوت معناداری در میانگین قطر زخم در گروه‌های مختلف تحت تیمار وجود داشته است ($P=۰/۰۰$) به گونه‌ای که بیشترین تأثیر را عصاره زغال اخته با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بهبود زخم داشته است (شکل ۲). همچنین میانگین اندازه زخم در گروه موش‌های دریافت‌کننده داروی گلوکانتیم در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده نرمال سالین و گروه بدون تیمار از نظر آماری تفاوت آماری معناداری داشته است ($P= ۰/۰۱۱$) و پس از دوره درمان، قطر زخم‌ها به طور قابل توجهی کاهش یافته و تقریباً بهبود یافته‌اند (شکل ۳) اما در گروه‌های کنترل قطر زخم افزایش یافته است. از سوی دیگر به منظور ارزیابی تأثیر عصاره هیدروالکلی زغال اخته بر جلوگیری از روند توسعه زخم و بهبود زخم، بار انگلی از طریق تهیه گسترش از حاشیه زخم‌ها و شمارش تعداد آماستیگوت‌های انگل در گروه‌های مختلف بررسی شد. نتایج حاصله نشان می‌دهد که در قبل از مداخله میانگین میزان بار انگلی در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($P>۰/۰۵$) و پس از مداخله میانگین بار انگلی در گروه‌های دریافت‌کننده گلوکانتیم، زغال اخته ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم به طور معنی‌داری از گروه‌های کنترل نرمال سالین و کنترل بدون درمان کمتر است. ($P<۰/۰۰۱$). تحلیل آماری نتایج نشان می‌دهد که تغییرات میانگین بار انگلی

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

قبل و پس از تیمار در گروه‌های دریافت‌کننده گلوکانتیم، زغال اخته ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم به طور معنی‌داری از گروه‌های کنترل نرمال سالین و کنترل بدون درمان بیشتر است (P<۰/۰۰۱). همچنین در مقایسه بار انگلی قبل و پس از درمان در تمامی گروه‌های مورد مطالعه به جز گروه کنترل بدون درمان تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵) به گونه‌ای که در گروه‌های تحت تیمار با گلوکانتیم و زغال اخته ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم پس از مداخله کاهش بار انگلی مشاهده شد درحالیکه در گروه کنترل نرمال سالین پس از مداخله افزایش بار انگلی مشاهده شد (جدول ۲).

نمودار ۱. نتایج قطر زخم در گروه‌های مورد مطالعه در زمان‌های مورد بررسی

شکل ۲. موش آلوده شده با لیشمانیا ماژور، گروه تیمار شده با عصاره زغال اخته با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم الف) قبل از درمان ب) پس از درمان

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

شکل ۳. موش آلوده شده با لیشمانیا ماژور، گروه تیمار شده با داروی گلوکانتیم الف) قبل از درمان ب) پس از درمان

جدول ۲. توزیع بار انگلی در زخم گروه‌های مورد و شاهد در زمان‌های مورد بررسی

گروه‌ها	وجود انگل			P-value	تغییرات قبل و بعد از مداخله
	۱+(۱۰-۱)	۲+(۱۰۰-۱۰)	۳+(۱۰۰۰-۱۰۰)		
	قبل از مداخله		بعد از مداخله		
شاهد بدون درمان	۲/۹۰±۰/۷۴		۳/۲۰±۰/۴۲	۰/۰۸۱	-۰/۳۰±۰/۵۸
شاهد با نرمال سالین	۲/۹۰±۰/۷۴		۳/۳۰±۱/۴۸	۰/۰۳۷*	-۰/۴۰±۰/۵۲
گلوکانتیم	۲/۹۰±۰/۸۸		۱/۴۰±۰/۵۲(a)	۰/۰۰۰*	۱/۵۰±۵۳(a)
زغال اخته ۲۰۰ میلی‌گرم	۲/۹۰±۰/۷۴		۱/۹۰±۰/۷۴(a)	۰/۰۰۲*	۱/۰۰±۰/۰۰(a)
زغال اخته ۴۰۰ میلی‌گرم	۲/۹۰±۰/۸۸		۱/۵۰±۰/۵۳(a)	۰/۰۰۰*	۱/۴۰±۰/۵۲ (a)

۱+= ۱۰-۱ عدد جسم لیشمن در هر میدان میکروسکوپی مشاهده شده.

۲+= ۱۰۰-۱۰ عدد جسم لیشمن در هر میدان میکروسکوپی مشاهده شده.

۳+= ۱۰۰۰-۱۰۰ عدد جسم لیشمن در هر میدان میکروسکوپی مشاهده شده.

مقادیر درون جدول mean+SD هستند. (a): نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه‌های کنترل بدون درمان و کنترل نرمال سالین است (P< ۰/۰۵)

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف تیمار با گروه شاهد بدون درمان است.

۴. بحث

بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت بیماری لیشمانیوز جزء شش بیماری عفونی انگلی اعلام شده است [۱]. در فقدان واکسن مؤثر بر ضد انگل لیشمانیا، استفاده از داروهای شیمیایی شامل ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان مانند پنتوستام، گلوکانتیم، آمفوتریسین B و میلتیفوسین تنها راه درمان این بیماری می‌باشد. اما به علت مقاومت ذاتی بعضی از سویه‌های انگل نسبت به دارو، سمیت و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، بازگشت بیماری، هزینه بالا و دوره درمان طولانی، تمایل به استفاده از فراورده‌های گیاهی با عوارض کمتر به عنوان دارو در درمان لیشمانیازیس را افزایش داده است بنابراین اخیراً تحقیق درخصوص استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان‌های جایگزین بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۲۸، ۲۷، ۱۰]. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در راستای ارزیابی اثرات عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان مختلف بر روی گونه‌های مختلف

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

لیشمانیا در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی در ایران و جهان انجام گرفته است و نتایج متفاوتی را گزارش نموده‌اند.

عزت‌پور و همکاران اثر گیاه *Pistacia khinjuk* را روی لیشمانیا تروپیکا در شرایط آزمایشگاه بررسی کردند و گزارش نمودند که IC_{50} برای پروماستیگوت‌ها برابر با ۵۸/۶±۳/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد [۲۹]. نیاپور و همکاران اثر ضدلیشمانیایی عصاره سیاه‌تخمه را بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاه بررسی کردند و نشان دادند که این عصاره بر زنده بودن انگل اثر دارد [۳۰]. در مطالعه دیگری براتی و همکاران فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه را بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور بررسی نموده‌اند [۳۱]. یخچالی و همکاران اثر گیاه خرزهره، دانه فلفل، پودر بادام و روغن کرچک بر روی گونه‌های لیشمانیا جداشده از ضایعات جلدی در شرایط آزمایشگاهی و تأثیر آن بر روند ایجاد ضایعه در موش سوری را بررسی نموده‌اند. همچنین در مطالعات دیگر تأثیر گیاهان یونجه سیاه (*Medicago lupulina*) [۲۷]، همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) [۳۲]، موسیر (*Allium hirtifolium*) [۵]، چای سبز (*Camellia sinensis*) [۳۳]، زرشک (*Berberis vulgaris*) [۳۴]، خرفه (*Portulaca oleracea*) [۳۵]، ترشک (*Rumex*) [۳۶]، آویشن شیرازی، بومادران، حنا [۳۷] بر روی گونه‌های مختلف لیشمانیا در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی بررسی شده است. زغال اخته در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های عفونی و شست و شوی زخم‌های جلدی استفاده می‌شود. وجود انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها همچنین ویتامین‌ها (E و C)، تانن و ریبوفلاوین سبب شده است تا تحقیقات گوناگونی روی این گیاه صورت گیرد، به طوری که خواص ضد مالاریایی [۳۸]، ضد میکروبی [۱۹]، ضد باکتریایی [۱۸]، آنتی‌آلرژیک [۳۹]، آنتی‌هیستامینی [۴۰]، ضد التهابی [۴۱]، تأثیرات آن در دیابت [۴۲] و غیره گزارش شده است [۱۶]. در این مطالعه تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زغال اخته بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط *in vitro* و زخم‌های ناشی از آن در موش‌های Balb/c ارزیابی شد. بنابراین ابتدا تأثیر غلظت‌های مختلف از عصاره گیاه زغال اخته بر اساس شاخص‌های F_{90} و IC_{50}بر پروماستیگوت‌های انگل در شرایط آزمایشگاهی به روش MTT ارزیابی شد. غلظت مهارکنندگی IC_{50} عصاره در زمان صفر، ۲۰/۳۷، در زمان شش، ۲۰/۳۷ و در زمان بیست و چهار، ۱۹/۳۳ بود. نتایج نشان داد که افزایش زمان تماس با انگل، تأثیر محسوسی در میزان مهارکنندگی و کشندگی عصاره نداشته است. شاخص F_{90} نیز برای گیاه زغال اخته در زمان‌های ۰، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۲۰/۲۵، ۱۰۸/۲۸، ۹۶/۲۴، ۸۱/۹۶ و ۷۳/۲۲ میلی‌گرم بود. کمترین جذب نوری در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین جذب نوری در غلظت های ۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زغال اخته بود. رضایی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای اثر سیتوتوکسیسیته عصاره هیدروالکلی میوه نارس و رسیده زغال اخته را در رده‌های سلول‌های سرطانی سینه، کبد و سلول نرمال تخمدان هامستر در غلظت ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی کردند. در این مطالعه میزان IC_{50} عصاره زغال اخته نارس و رسیده نسبت به سلول‌های سرطانی تفاوت معنی‌داری را نشان داده است به گونه‌ای که با افزایش زمان تماس، کاهش چشمگیری در میزان IC_{50} مشاهده شده است، اما سیتوتوکسیته میوه نارس نسبت به رسیده بیشتر بود [۴۳]، اما در مطالعه حاضر افزایش زمان تماس، باعث افزایش چشمگیری در میزان کشندگی عصاره نشده است، که این ممکن است به دلیل تفاوت در پاسخ

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

سلولی در سلول‌های سرطانی و پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور باشد. Milenković-Anđelković و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در یوگوسلاوی تأثیر ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی عصاره میوه و برگ زغال اخته را با ترکیب حلال‌های متانول، استون، آب و اسید فورمیک، روی ۱۳ گونه میکروارگانیسم میکروبی و مخمری بررسی کردند. در این مطالعه عصاره میوه و برگ زغال اخته هر دو به صورت معناداری فعالیت ضدمیکروبی بالایی داشتند، اما عصاره برگ زغال اخته نسبت به میوه آن فعالیت ضد میکروبی و ضد مخمری بالاتری نسبت به عصاره میوه داشته است، همچنین در بررسی میزان ترکیبات فنلی، عصاره میوه مذکور غنی از آنتوسیانین، اسیدهای فنلی، الاجیک اسید، گالیک اسید و کلرومیک اسید بود و عصاره برگ نسبت به میوه میزان فنول تام و محتوای فلاونوییدی بالاتری داشت، که فعالیت ضد میکروبی بالاتر عصاره برگ زغال اخته نسبت به عصاره میوه آن احتمالاً می‌تواند ناشی از وجود ترکیبات فراوان فنلی در عصاره برگ زغال اخته باشد [۴۴]. در مطالعه Milenković-Anđelković و همکارانش عصاره‌گیری با ترکیب حلال‌های متانول، استون، آب و اسید فورمیک در برگ و میوه گیاه زغال اخته بود اما در مطالعه حاضر از حلال اتانول در عصاره‌گیری میوه زغال اخته استفاده شد که تأثیر بسیار بالایی داشت اما عصاره برگ گیاه مورد بررسی قرار نگرفت و از این جهت با مطالعه Milenković-Anđelković تفاوت داشت. همچنین Mansour و همکاران در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره آبی و متانولی برگ گیاه *Vitis vinifera* بر پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم در محیط کشت انجام داده‌اند، نشان داد که عصاره اتانولی این گیاه با IC_{50} برابر ۰/۱۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به علت وجود منبع غنی از تانن، فلاونوئید، پروسیانیدین، آنتوسیانین، اسیدهای آلی و ویتامین‌ها دارای اثرات بالقوه‌ای بر ضد پروماستیگوت‌های لیشمانیا می‌باشد [۴۵]. معروفی و همکاران نیز تأثیر عصاره متانولی میوه زالزالک را روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی بررسی کرده‌اند و نشان دادند که IC_{50} پس از ۲۴ ساعت ۴۹/۱۳ μg/ml به دست آمده است، همچنین این عصاره تا حدودی مانع از تکثیر اماستیگوت‌های انگل در ماکروفاژهای صفاق موش شده است که ممکن است ناشی از ترکیبات پلی فنلی موجود در این میوه باشد [۴۶]. بنابراین ترکیبات مؤثر گیاه زغال اخته از قبیل آنتوسیانین و پلی‌فنل‌ها می‌تواند در فعالیت ضد لیشمانیایی این گیاه نقش مؤثری داشته باشند. نتیجه تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زغال اخته بر روی قطر زخم و شدت آلودگی (تعداد پروماستیگوت) در مدل موشی در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به طور معنی‌داری باعث کاهش بار انگلی شد و در هر دو غلظت باعث کاهش قطر زخم شد، بویژه در غلظت ۴۰۰ که از نظر قدرت بهبودی بسیار به نتیجه داروی گلوکانتیم نزدیک بود. زغال اخته بر اساس وجود ترکیباتی از قبیل پلی فنولیک و آنتوسیانین می‌تواند باعث القا ایمنی محافظتی بر ضد لیشمانیا ماژور در موش و بهبود زخم از طریق مکانیسم‌های مختلف مانند فعال کردن ماکروفاژها و تولید نیتریک اکساید همچنین فعال کردن مسیر ایمنی سلولی بواسطه سایتوکین‌ها شود. Kolodziej و همکاران اثرات ضد لیشمانیایی و قدرت تعدیل‌کنندگی ایمنی ۶۷ تانن (متابولیت‌های فنلی) و ترکیبات وابسته آن در شرایط خارج و داخل سلولی در سلول‌های RAW 264.7، همچنین فعالیت ماکروفاژها در ارتباط با لیشمانیا ماژور و لیشمانیا دنووانی را از طریق بررسی آزادسازی نیتریک اکساید و بیان سایتوکین‌های (IFN-α, IFN-γ, TNF- α, IL-1, IL-10, IL-12, IL-18) در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی نموده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که اگرچه این ترکیبات اثر کمی بر اشکال

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

پروماستیگوت داشته‌اند اما میزان بقا اشکال آماستیگوت داخل سلول را کاهش می‌دهد همچنین در ماکروفاژهای آلوده باعث القاء مسیر نیتریک اکساید و سایتوکین‌های IFN-α، TNF-α، IFN-γ، IL-12, IL-18 و IL-1 شده است که دارای نقش مهمی در دفاع ضد لیشمانیایی در شرایط شبیه به فعال شده سیستم ایمنی سلولی میزبان مهره‌دار در مراحل ابتدایی آلودگی است [۴۷]. همچنین Wong و همکاران فعالیت ضدلیشمانیایی ۳۹ ترکیب از فلاونوئیدهای دایمری بر ضد گونه‌های لیشمانیا برازیلینسیس، لیشمانیا آمازونینسیس، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی را گزارش نموده‌اند [۴۸]. با توجه به نتایج اثر عصاره زغال اخته بر پروماستیگوت لیشمانیا ماژور و همچنین اثر عصاره زغال اخته در شرایط *in vivo* بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور، عصاره این میوه را می‌توان به عنوان کاندید مطالعات بیشتر و تست روی موارد انسانی در نظر گرفت و تبدیل این عصاره‌ها به اشکال دارویی و استخراج مواد مؤثره آنها جهت به دست آوردن ترکیبات مؤثره آن در راستای داروی جدید جهت درمان لیشمانیوز جلدی کمک‌کننده باشد.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد عصاره زغال اخته در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌های پایین بر لیشمانیا ماژور مؤثر می‌باشند. در مدل موشی عصاره زغال اخته در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش تعداد و حتی پاک شدن کامل محل ضایعه از انگل لیشمانیا شد، بویژه نتایج غلظت ۴۰۰ که بسیار به داروی گلوکانتیم نزدیک است.

مشارکت نویسندگان

بهمن خلیلی و رحمان عبدی‌زاده در طراحی و نظارت اجرای مطالعه شرکت داشته‌اند، حمیدرضا مردانی و زهرا لری گوئینی در انجام مراحل آزمایشگاهی نقش داشته‌اند. بهمن خلیلی، رحمان عبدی‌زاده و حمیدرضا مردانی در نوشتن و بررسی مقاله مشارکت داشته‌اند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تقدیر و تشکر

این مقاله منتج از پایان‌نامه کد (IR.SKUMS.REC.1397.20) در رشته کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی است که در قالب طرح تحقیقاتی در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهرکرد مصوب شده است. بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (کد ۲۶۷۵) و کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

1. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J and Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017; 6: 750-65. PubMed PMID: 28649370.

2. Alemayehu B and Alemayehu M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Sci. J.* 2017; 11 (4): 519-24.

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

3. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* 2013; 58: 227-50. PubMed [PMID: 23317043].

4. Schuster FL and Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (3): 374-89.

5. Feiz Haddad MH, Khodkar I and Samie M. *In Vitro* Anti-leishmanial Effects of Hydroalcoholic Extracts From Six Iranian Medicinal Herbs on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) Promastigotes. *Jentashapir J. Health R*es. 2016; 7 (3): e33465. Epub 2016-02-01.

6. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J and et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*. 2012; 7 (5): e35671. PubMed [PMID: 22693548].

7. Abdollahi B, Mesgari Abbasi M, Zakeri Milani P, Nourdadgar AS, Banan Khojasteh SM and Nejati V. Hydro-methanolic extract of cornus MAS L. And blood glucose, lipid profile and hematological parameters of male rats. *Iran. Red Crescent Med. J.* 2014 May; 16 (5): e17784. PubMed [PMID: 25031858].

8. Fournet A, Barrios AA, Munoz V, Hocquemiller R, Cavé A and Bruneton J. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1993; 37 (4): 859-63.

9. Al-Snafi AE. Antiparasitic effects of medicinal plants (part 1)-A review. *J. Pharm*. 2016; 6 (10): 51-66.

10. Bahmani M, Saki K, Ezatpour B, Shahsavari S, Eftekhari Z, Jelodari M and et al. Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed*. 2015; 5 (9): 695-701.

11. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iran. J. Vet. Res.* 2015; 16 (1): 1-19.

12. Soosaraei M, Fakhar M, Teshnizi SH, Hezarjaribi HZ and Banimostafavi ES. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Med. Surg*. 2017; 21: 63-80.

13. Tural S and Koca I. Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Sci. Hortic*. 2008; 116 (4): 362-6.

14. Mikaili P, Koohirostamkolaei M, Babaeimarzangou SS, Aghajanshakeri S, Moloudizargari M, Gamchi NS and et al. Therapeutic uses and pharmacological effects of *Cornus mas*: A review. *J. Pharm. Biomed. Sci*. 2013; 35 (35): 1732-8.

15. Mozaffarian V. Trees and shrubs of Iran. Farhang-e-Moaser, Tehran. 2005.

16. Hosseinpour-Jaghdani F, Shomali T, Gholipour-Shahraki S, Rahimi-Madiseh M and Rafieian-Kopaei M. *Cornus mas*: a review on traditional uses and pharmacological properties. *J. Complement. Integr. Med.* 2017; 14 (3): PubMed PMID: 28782352.

17. Seeram NP, Schutzki R, Chandra A and Nair MG. Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in Cornus species. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50 (9): 2519-23. PubMed [PMID: 11958615].

18. Turker AU, Yildirim AB and Karakas FP. Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2012; 26 (1): 2765-72.

19. Radovanović BC, Anđelković S, Radovanović AB and Anđelković MZ. Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

grown in southeast Serbia. *Trop. J. Pharm. Res*. 2013; 12 (5): 813-9.

20. Anthony JP, Fyfe L, Stewart D, McDougall GJ and Smith HV. The effect of blueberry extracts on *Giardia duodenalis* viability and spontaneous excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *in vitro*. *Methods* 2007; 42 (4):339-48. PubMed [PMID: 17560322].

21. Grabensteiner E, Liebhart D, Arshad N and Hess M. Antiprotozoal activities determined *in vitro* and *in vivo* of certain plant extracts against *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* sp. *Parasitol. Res*. 2008; 103 (6): 1257-64. PubMed [PMID: 18751730].

22. Baharvandi Z and Sadraei J. Comparison of the Effect of Metronidazole, Tinidazole, Mango and Blueberry Extracts on *Trichomonas vaginalis in Vitro*. *Infect. Epidemiol. Microbiol*. 2016; 2 (3): 24-7.

23. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C and Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 2005; 54 (2): 119-22.

24. Yektaian N, Rafieian M, Khalili B, Hejazi S, Shirani BL and Hosseini S. Effect of combination of *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium* & *Juglans regia leaves* extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER), *in vitro*. *J. Med. Plants* 2012; 11 (9): 197-204.

25. Fumarola L, Spinelli R and Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. *Res. Microbiol.* 2004; 155 (4): 224-30.

26. Bidabady Sh, Mahmoudi M, Sabery S and Zolfaghari A. The effectiveness of mix extracts of Thyme, Yarrow and Propolis on Cutaneous Leishmaniasis: a comparative study in animal model (Balb/c). *Tehran Univ. Med. J.* 2009; 66 (11): 785-90.

27. Eskandari EG and Doudi M. 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. Shaheed Sadoughi Univ. Med. Sci.* 2016; 24 (2): 174-84.

28. Haghighati F, Jafari S and Beyt Elahi J. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an *in vitro* study. *Hakim Res. J*. 2003; 6 (3): 71-6.

29. Ezatpour B, Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Azadpour M and Ezzatkhah F. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *Evid. Based Complement Alternat. Med*. 2015; 2015 (145): 13-23.

30. Niapour A, Bohlooli S, Sharifi Pasandi M and Mohammadi-ghalehbin B. *In vitro* Anti leishmanial effect of *Agrostemma githago* extract on *Leishmania Major* Promastigotes by Cell Count and MTT Assay. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci*. 2018; 28 (165): 13-23.

31. Barati M, Sharifi L and Sharififar F. Antileishmanial activity of *Artemisia aucheri*, *Ferula asafoetid* and *Gossypium hirsutum* extracts on *Leishmania major* promastigotes *in vitro*. *Ann. Mil. Health. Sci. Res.* 2010; 8 (3): 166-72.

32. Maspi N, Ghafarifar F, Bahrami A, Bastaminejad 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*. *J. Ilam. Univ. Med. Sci*. 2010; 18 (1): 28-33.

33. Allahdin S, Khademvatan S, Hashemitabar M and Eskandari A. *In vitro* activity of

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

Camellia sinensis extracts against *L. major* and *L. infantum* promastigotes using the colorometric MTT assay. *Urmia Med. J.* 2014; 25 (10): 893-900.

34. Fata A, Rakhshandeh H, Berenji F and Jalalian FA. Treatment of cutaneous leishmaniasis in murine model by alcoholic extract of *Berberis vulgaris. Iran. J. Parasitol*. 2006; 1 (1): 39-42.

35. Gharirvand EE and Doudi M. The study of composition and anti-leishmania effect of portulaca oleracea aerial organs hydroalcoholic extract on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) and a clinical isolate *in vitro*. *J. Rafsanjan Univ. Med. Sci.* 2016; 15 (5): 425-438.

36. Nursabaghi F, Abedinzade M and Jalallou N. Evaluation the effect of Rumex alcoholic extract against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Balb/c mice. *Razi J. Med. Sci*. 2016; 23 (148): 28-35.

37. Hejazi SH, Shirani-Bidabadi L, Zolfaghari-Baghbaderani A, Saberi S, Nilforoushzadeh M, Moradi S and et al. Comparison effectiveness of extracts of Thyme, Yarrow, Henna and Garlic on cutaneous leishmaniasis caused by *L. major* in animal model (Balb/c). *J. Med. Plants* 2009; 8 (30): 129-60.

38. Vareed SK, Reddy MK, Schutzki RE and Nair MG. Anthocyanins in Cornus alternifolia, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. *Life Sci*. 2006; 78 (7): 777-84.

39. Rogerio AP, Kanashiro A, Fontanari C, da Silva EV, Lucisano-Valim YM, Soares EG and et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm. Res.* 2007; 56 (10): 402-8. PubMed [PMID: 18026696].

40. Asgary S, Rafieian-Kopaei M, Shamsi F, Najafi S and Sahebkar A. Biochemical and histopathological study of the anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in alloxan-induced diabetic rats. *J. Complement. Integr. Med.* 2014; 11 (2): 63-9.

41. Asgary S, Kelishadi R, Rafieian-Kopaei M, Najafi S, Najafi M and Sahebkar A. Investigation of the lipid-modifying and antiinflammatory effects of *Cornus ma*s L. supplementation on dyslipidemic children and adolescents. *Pediatr. Cardiol.* 2013 Oct; 34 (7): 1729-35. PubMed [PMID: 23625305].

42. Gorji A, Soltani R, Keshvari M, Ghanadian M, Asgary S and Sarrafzadegan N. The effects of cranberry on glucose levels and HbA1C with type 2 diabetes patients-a randomized clinical trial. *J. Shahrekord Univ. Med. Sci.* 2014; 16: 115-22.

43. Rezaei F, Shokrzadeh M, Majd A and Nezhadsattari T. Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of *Cornus mas* L. fruit on MCF7, HepG2 and CHO cell line by MTTAssay. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci.* 2014; 24 (113): 130-8.

44. Milenković-Anđelković AS, Anđelković MZ, Radovanović AN, Radovanović BC and Nikolić V. Phenol composition, DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of Cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts. *Hem. Ind*. 2015; 69 (4): 331-7.

45. Mansour R, Haouas N, Kahla-Nakbi AB, Hammami S, Mighri Z, Mhenni F and et al. The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum*. *Iran. J. Pharm. Res.* 2013; 12 (3): 349.

46. Maroufi Y, Dabirzadeh M and Hossein-Pour-Mousavi S. Effect of methanolic extract of hawthorn (*Crataegus aronia*) fruit on *Leishmania major in vitro*. *Feyz.* 2016; 20 (1): 11-15.

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

47. Kolodziej H and Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochem.* 2005; 66(17): 2056-71.
48. Wong IL, Chan K-F, Chen Y-F, Lun Z-R, Chan TH and Chow LM. *In vitro* and *in vivo* efficacy of novel flavonoid dimers against cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58 (6): 3379-3388.

How to cite this article: Mardani HR, Abdizadeh R, Lorigooini Z, Khalili B. A study on the effect of hydroalcholic extracts of cornus mas on leishmania major *in vitro* condition and wounds in Balb/C mice. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(74): 239-254.
doi: 10.29252/jmp.19.74.239

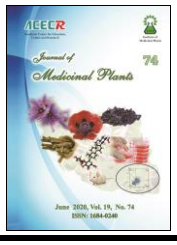
[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]

J. Med. Plants 2020; 19(74): 239-254

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

A study on the effect of hydroalcholic extracts of *Cornus mas* on *Leishmania major in vitro* condition and wounds in Balb/C mice

Hamid Reza Mardani[1], Rahman Abdizadeh[1], Zahra Lori gooini[2], Bahman Khalili[1,*]

[1] *Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran*

[2] *Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran*

ARTICLE INFO

Keywords:
Cornus mas
Leishmaniasis
Leishmania major

ABSTRACT

Background: Antileishmaniasis drugs such as antimonials have problems such as disease recurrence, drug resistance, side effects and long-term treatment period. Therefore it seems necessary to search for new drugs, particularly herbal compounds with no side effects. **Objective:** The present study was conducted to investigate the effect of hydroalcholic extract of *Cornus mas* on *Leishmania major* in vitro and wounds in Balb/c mice. **Methods:** Various concentrations of hydroalcholic extract of *Cornus mas* were prepared using maceration method in 80% ethanol. Then, 100 µl RPMI medium containing 5×10^5 /well *leishmania major* promastigote was added to 96-well cell culture plates. Afterwards extract was added in each concentrations and the plate was incubated at 26 °C on 0h, 24h, 48h, and 72h. Then the MTT solution was added and absorbance was measured with ELISA reader in 570 nm in vivo: 60 Balb/c mouse after inoculation of *L. major* promastigote in the base their tail, after leishmaniasis lesions concentrations of 200 and 400 mg/kg of extract were injected to test groups one day in between for 30 days. Diameter and condition wound healing was recorded before and after the treatment. Then results were analyzed by SPSS software. **Results:** The findings revealed that the effect of *C. mas* on *leishmania* was dependent on dose of extract and time treatment also all concentrations of the extract could reduce the diameter of the wound and reduce parasitic load. **Conclusion:** The results indicated that extract of *C. mas* had the favorable effect in leishmanicidal activity in experimental conditions and in the animal model. Based on this, it is recommended that the effect of the herbal ointment and gel in the future on leishmaniasis should be investigated.

Abbreviations: SPSS, Statistical Package for the Social Sciences; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; RPMI, Roswell Park Memorial Institute.

* Corresponding author: nkhalili@sbmu.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.74.239

Received 27 August 2018; Received in revised form 16 January 2019; Accepted 7 May 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2025-11-04]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.8.6]

[DOI: 10.29252/jmp.19.74.239]