

## بررسی اثر بخشی اسانس ساتوریا خوزستانیکا بر لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)

مهدی آسمار<sup>۱</sup>، صیام آسیابی<sup>۲</sup>، روح اله فتاحی<sup>۳\*</sup>، لیلا مدیری<sup>۴</sup>، مهین فرهمند<sup>۱</sup>، خسرو عیسی زاده<sup>۲</sup>،  
شهریار یآوری<sup>۴</sup>

(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۲)

### چکیده

این مطالعه به منظور تعیین اثربخشی عصاره گیاهی «ساتوریا خوزستانیکا» بر روی «لیشمانیا ماژور» در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. در مطالعه حاضر گونه استاندارد لیشمانیا ماژور MRHO/IR/75/ER که قبلا در موسسه تحقیقاتی پاستور در محیط NNN کشت داده شده بود استفاده شد. این انگل از محیط NNN به محیط RPMI 1640 منتقل شد و وقتی که به رشد لگاریتمی رسید تعداد مشخصی از انگل به پلیت های کشت منتقل شدند. میزان اثر بخشی غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم از عصاره گیاهی ساتوریا خوزستانیکا بر روی پرومستیگوت های لیشمانیا ماژور در ۲۴ و ۷۲ ساعت مورد بررسی و با گلوکانتیم مقایسه شدند. میزان اثربخشی غلظت های ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میکروگرم به میکرولیتر از عصاره گیاهی ساتوریا خوزستانیکا برای به دست آوردن حداقل اثر بخشی این عصاره مورد آزمایش قرار گرفتند. اثر بخشی عصاره ساتوریا خوزستانیکا و گلوکانتیم بر پرومستیگوت های لیشمانیا ماژور در مقایسه با کنترل بعد از ۷۲ ساعت بررسی شدند، میزان کاهش پرومستیگوت ها در محیط های اثر ساتوریا خوزستانیکا با غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم به میلی لیتر به ترتیب ۵۶/۱۴، ۷۷/۱۹ و ۷۷/۱۹ درصد و در گلوکانتیم ۱۹/۲۹، ۲۴/۵۶ و ۳۳/۳۳ درصد بود. حداقل غلظت موثر عصاره ساتوریا خوزستانیکا ۲۵۰ میکروگرم به میلی لیتر بود. عصاره گیاهی ساتوریا خوزستانیکا اثر قابل توجه بر روی لیشمانیا ماژور در مقایسه با داروی گلوکانتیم داشت.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، گلوکانتیم، عصاره گیاهی ساتوریا خوزستانیکا.

۱. موسسه تحقیقاتی انستیتوپاستور تهران

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد لاهیجان

۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد انگل شناسی دامپزشکی دانشگاه تهران

۴. عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد واحد لاهیجان

\*. مسئول مکاتبات؛ پست الکترونیکی: fatahy@ut.ac.ir

## مقدمه:

لیشمانیوز بیماری است که به وسیله انگل تک یاخته ای داخل سلولی لیشمانیا ایجاد می شود (۱۳). مخازن این بیماری جوندگان، سگ ها و دیگر حیوانات وحشی می باشد. بیماری به وسیله ی پشه های جنس لوتزمیا و فلبوتوموس منتقل می شود. طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت ۸۸ کشور تحت تاثیر بیماری لیشمانیوز هستند و حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا هستند. حدود ۱۲ میلیون نفر در جهان مبتلا به لیشمانیوز می باشند و سالیانه ۱-۲ میلیون مورد جدید آلودگی به لیشمانیا مشاهده می شود. بیماری لیشمانیوز ۳ شکل بالینی دارد: ۱- لیشمانیوز احشایی (کالآزار) ۲- لیشمانیوز جلدی ۳- لیشمانیوز جلدی مخاطی (۶).

تعداد داروهای موثر در دسترس برای این بیماری بسیار محدود اند که شامل ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی، پنتامیدین، آمفوتریپسین B، پاراموماپسین می باشند (۹). ترکیبات آنتی موان پنج ظرفیتی هنوز هم داروی انتخابی اول در درمان این بیماری محسوب می شوند. از انجایی که تزریق روزانه ترکیبات آنتی موان پر زحمت، گران و دارای اثرات سمی است، ارزیابی راه های دیگر از جمله درمان های موضعی مورد توجه قرار گرفته است. در سال های اخیر مشخص شده است که ترکیبات برگرفته از طبیعت تا حد زیادی می تواند خاصیت ضد لیشمانیایی داشته باشد. دارو های گیاهی موضعی به لحاظ منشاء طبیعی آن ها در صورت اثر بخشی مناسب می توانند جانشین خوبی برای داروهای شیمیایی تزریقی باشند (۵). در این مطالعه فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره گیاه ساتوریا خوزستانیکا بر روی پرومستیگوت های لیشمانیا مازور در مقایسه با گلوکانتیم بررسی شده است.

## مواد و روش ها:

## جمع آوری و عصاره گیری گیاه ساتوریا خوزستانیکا Satureja Khuzestanika :

اسانس از پودر خشک شده سربرگهای گیاه مذکور به روش تقطیر با آب مقطر در دستگاه کلونجر ساخت ایران به مدت ۵ ساعت گرفته شد در این روش مواد گیاهی و آب با هم در یک ظرف مخلوط شده و جوشیدند. آب و اسانس با هم تبخیر شدند و مخلوط بخار از میان یک لوله رابط به درون خنک کننده وارد شدند و به دلیل اختلاف وزن مخصوص آب و اسانس، اسانس حاصله که روغنی و نارنجی رنگ بود جدا گردید و سپس توسط سولفات سدیم ذرات آب معلق در آن گرفته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. لازم به ذکر است از هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه ۰/۹ سی سی اسانس به دست آمد. با استفاده از  $DMSO\%1 + PBS$ ، رقت های مختلف اسانس تهیه شد.

## کشت انگل:

در این مطالعه از سویه استاندارد major Leishmania (MRHO/IR/75/ER) موجود در موسسه تحقیقاتی انستیتوپاستور تهران استفاده شد. پرومستیگوت های انگل در محیط RPMI160 حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد کشت و نگه داری شدند سپس پرومستیگوت هایی که در محیط کشت به فاز ثابت رشد رسیدند با استفاده از لام هموسیتومتر در زیر میکروسکوپ شمارش و به تعداد  $5 \times 10^5/ml$  تعدیل گردید. رقتهای ۲۵۰-۳۰۰-۳۵۰-۴۰۰-۴۵۰-۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره گیاهی به محیط های کشت حاوی انگل اضافه گردید و در ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت بعد تعداد پرومستیگوت های زنده در هر رقت مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از کنترل

در جدول شماره ۱ و ۲ میزان اثر رقت های مختلف گیاه ساتوریا خوزستانیکا و گلوکانتیم بر تعداد پرومستیگوت های لیشمانیا ماژور آورده شده است. غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و بالاتر عصاره روغنی ساتوریا خوزستانیکا کاملاً بر پرومستیگوت انگل موثر بوده و رابطه ی معنی داری از لحاظ آماری بین میزان اثر عصاره گیاهی در مقایسه با گلوکانتیم مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

منفی (محیط حاوی انگل و فاقد عصاره گیاهی) و کنترل مثبت (محیط های حاوی انگل که به آن ها گلوکانتیم بارقتهای مشابه عصاره گیاهی اضافه شد) استفاده گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری:

داده های به دست آمده با نرم افزار spss ورژن ۱۶ و با آزمون t با دقت ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

### نتایج:

جدول ۱: اثر اسانس روغنی ساتوریاخوزستانیکا بر روی میانگین تعداد پرومستیگوتهای لیشمانیاماژور در زمانها و غلظت های مختلف در مقایسه با شاهد دارویی گلوکانتیم (کنترل مثبت) و شاهد تیمار نشده (کنترل منفی)

غلظت های مختلف از گلوکانتیم و اسانس روغنی بر حسب میکرو گرم در میلی لیتر (µg/ml)						تیمارها	
غلظت ۱۰۰۰			غلظت ۵۰۰			شاهد تیمار نشده (کنترل)	
اسانس روغنی	گلوکانتیم	اسانس روغنی	گلوکانتیم	اسانس روغنی	گلوکانتیم	زمان بر حسب ساعت	درصد کاهش انگل ها نسبت به کنترل
۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۰ ساعت	
۰	۱۲۰۰۰۰	۰	۱۵۰۰۰۰	۸۰۰۰۰	۱۶۰۰۰۰	۲۴ ساعت	۱۸۰۰۰۰
۰	۱۳۰۰۰۰	۰	۱۵۰۰۰۰	۴۰۰۰۰	۱۷۰۰۰۰	۷۲ ساعت	۲۶۰۰۰۰
۷۷,۱۹	۳۳,۳۳	۷۷,۱۹	۲۴,۵۶	۵۶,۱۴	۱۹,۲۹	درصد کاهش انگل ها نسبت به کنترل	

جدول ۲: اثر اسانس روغنی ساتوریا خوزستانیکا بر روی میانگین تعداد پرومستیگوتهای لیشمانیاماژور در زمانها و غلظت های مختلف در مقایسه با شاهد تیمار نشده (کنترل)

غلظت های مختلف از اسانس روغنی بر حسب میکروگرم در میلی لیتر (µg/ml)					تیمارها	
شاهد تیمار نشده (کنترل)					زمان بر حسب ساعت	
۴۵۰	۴۰۰	۳۵۰	۳۰۰	۲۵۰	زمان بر حسب ساعت	درصد کاهش انگل ها نسبت به کنترل
۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۱۳۰۰۰۰	۰ ساعت	
۰	۰	۰	۰	۸۰۰۰۰	۲۴ ساعت	۱۸۰۰۰۰
۰	۰	۰	۰	۴۰۰۰۰	۷۲ ساعت	۲۶۰۰۰۰
۷۷,۱۹	۷۷,۱۹	۷۷,۱۹	۷۷,۱۹	۵۶,۱۴	درصد کاهش انگل ها نسبت به کنترل	

### بحث و نتیجه گیری:

داروهای انتخابی برای درمان لیشمانیوز جلدی و احشایی ترکیبات پنج ظرفیتی استیبوگلوکونات سدیم (پنتوستام) و مگلومین آنتیموان (گلوکانتیم) می باشد (۱۱). این داروها حدود ۵۰ سال است که برای درمان بیماری لیشمانیوز استفاده می شوند. از مشکلات این داروها دوره درمانی طولانی و احتمال ایجاد مسمومیت می باشد (۱۴). استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری های انگلی به زمان های باستان برمی گردد که از به عنوان داروی ضد مالاریا استفاده شده است (۱۰).

در ایران مطالعات مختلفی در زمینه گیاهان دارویی و اثرات آنها بر روی برخی تک یاخته ها صورت گرفته است مانند اثرات ضد مالاریایی و ضد تریکومونایی گیاه درمنه کوهی و همچنین گیاه مورد و آویشن شیرازی بر تریکوموناس واژینالیس (۴). مطالعات زیادی در مورد اثرات گیاه های مختلف بر انگل لیشمانیا در محیط invitro و invivo صورت گرفته که با نتایج مختلفی همراه بوده است. در مطالعه یوسفی و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر کشندگی گیاهان پکانوم هارمالا و آلکانا تینکتورا را بر لیشمانیا ماژور در شرایط invitro انجام دادند و دریافتند که هردو عصاره دارای اثر مهاری بر پرومستیگوت ها هستند. (۱۵)

اسدی و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثرات ضد لیشمانیایی دو گیاه *Stachys lavandulifolia* و *Mespilus germanica* بررسی کردند و به نتایج قابل توجهی دست یافتند (۳).

گیاه ساتوریا خوزستانیکا خواص دارویی زیادی دارد و در مطالعات مختلف اثرات درمانی این گیاه بررسی شده است. این گیاه دارای خاصیت آنتی ویروسی (۱) ضد تک یاخته ای (۱۲) آنتی اکسیدانت (۸) و ضد اسهال (۷) می باشد. همچنین خاصیت ضد باکتریایی ساتوریا خوزستانیکا در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس و فعالیت ضد قارچی در برابر کاندیدا البیکنس و کریپتوکوکوس نتوفورمنس نشان داده شده است (۱۶، ۲۰).

در مطالعه حاضر رابطه معنی داری بین میزان اثر عصاره روغنی گیاه ساتوریا خوزستانیکا بر روی پرومستیگوت های لیشمانیا ماژور در مقایسه با گلوکانتیم مشاهده شد. این عصاره روغنی در غلظت ۳۰۰ میکروگرم و بالاتر همه ی پرومستیگوت ها را در محیط کشت از بین برد. باتوجه به نتایج این مطالعه میزان تاثیر عصاره روغنی این گیاه در شرایط invitro پیشنهاد می شود تا در صورت اثر بخشی مناسب به عنوان یکی از روش های موثر درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

### منابع:

- 1-Abad, M.J., Bermejo, P., Gonzales, E., Iglesias, I., Irurzun, A., Carrasco, L., 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology*. 32: 499-503.
- 2-Amanlov, M., Fazeli, M.R., Arvin, A., Amin, H.G., Farsam, H., 2004. *Fitoterapia* 75: 768.
- 3-Asadi, M., Bahrami, S., Ansari Samani, R., 2010. The effect of *Stachys lavandulifolia* vahl and *Mespilus germanica* L leaves hydroalcoholic extracts on leishmania major (MRHO/IR/75/ER). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 5(1): 39-43.
- 4-Azadbakht, M., Ziai, H., Abdollahi, F., Shabankhani, B., 2003. Effect of essential oils of *Artemisia Aucheri* Bioss., *Zataria Multiflora* Bioss and *Myrtus Communis* L. on *Trichomonas Vaginalis*. *Journal of Medical Plants*. 8(2): 35-40 .

- 5-Berman, J.D., 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infection Disease*. 24(4):684-703.
- 6-De carvalho, P.B., Ferreira, E.I., 2001. Leishmaniasis phytotherapy Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*. 72: 599-618.
- 7-Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A.R., Mohseni, M., 2000. Antispasmodic and antidiarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 187-192.
- 8-Hashemi, M.B., Niakousari, M., Saharkhiz, M.J., Eskandari, M.H., 2011. Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on oxidative stability of sunflower oil during accelerated storage. *Natural Product Research*. 41: 31-36.
- 9-Jha, T.K., 2006. Drug unresponsiveness and combination therapy for kala-azar. *Indian Journal of Medical Research*. 123, 389-398.
- 10-Kayser, O., Kiderlen, A., Croft, S.L., 2002. Natural products as potential antiparasitic drugs, In: Atta-ur-Rahman (Hg.), *Studies in Natural Products Chemistry, Part G: Bioactive Natural Products*, Amsterdam. Elsevier Science BV26.(12): 779- 848.
- 11-Koff, A.B., Rosen, T., 1994. Treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of American Academy of Dermatology*. 31(5): 693-708.
- 12-Momtaz, S., Abdollahi, M. A., 2008. Systematic Review of the Biological Activities of *Satureja* L. Species. *Pharmacology*. 2: 34.
- 13-Sharif, M., Ziaei, H., Azadbakht, M., Daryani, M., Ebadattalab, A., Rostami, M., 2006. Effect of Methanolic Extracts of *Artemisia aucheri* and *Camellia sinensis* on *Leishmania major* (In Vitro). *Turkish Journal of Medical Science*. 36 (6): 365-369.
- 14-Thakur, C.P., Singh, R.K., Hassan, S.M., Kumar, R., Narain, S., Kumar, A., 1999. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with never modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 93: 319- 23.
- 15-Yousefi, R., Ghaffarifar, F., Dalimi Asl, A., 2009. The effect of *alkanna tinctoria* and *peganum harmala* extracts on *leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. *Iranian Journal of Parasitology*. 4(1): 45-52.
- 16-Zarrin, M., Amirrajab, N., Sadeghi-Nejad, B., 2010. In vitro antifungal activity of *Satureja Khuzestanica* Jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Pakistan Journal of Medical Science*. 26(4): 880-882

