بررسی اثر حفاظتی عصاره گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica L*) بر القای آپوپتوز و پرولیفراسیون انگل *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی

مهناز کریمی*[۱]، الهه تاج بخش[۲]*، حسن ممتاز[۲]

۱-دانش آموخته ی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نویسندگان مسئول:

karimimahnaz72@gmail.com

ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده

با توجه به شیوع لیشمانیوز در مناطق مختلف جهان و ایران و نظر به اینکه ترکیبات پنج‌ظرفیتی آنتی‌موان برای درمان بیماری دارای عوارض جانبی متعددی می باشد، استفاده از گیاهان دارویی مورد تأکید قرار گرفته است. این تحقیق به منظور تعیین تأثیر عصاره گیاه دارویی بادرشبی (*Dracocephalum moldavica L*) بر روی آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی به روش رنگ‌سنجی انجام گرفت.

در این مطالعه تجربی *لیشمانیا ماژور* (*Lishmania Major*) سویه استاندارد به محیط کشت $RPMI_{1640}$ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شد و تا زمان رشد کامل در دمای ۳۷ درجه و فشار ۵ درصد CO_2 انکوباتور در مدت ۴-۳ روز در شرایط استریل نگهداری شد. سپس در مرحله ثابت رشد تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه بادرشبی در مقایسه با داروی کنترل بر روی آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT، مورد بررسی قرار گرفت.

درصد انگل‌های زنده در حضور غلظت‌های مختلف عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشبی پس از گذشت زمان‌های مختلف از کشت انگل کاهش چشمگیری داشتند. میزان IC_{50} عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشبی در زمان‌های مختلف در مهار *لیشمانیا ماژور* اثر چشمگیری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، *لیشمانیا ماژور*، گیاه بادرشبی، پرولیفراسیون.

مقدمه

لیشمانیوز در شمار بیماری‌های مشترک انسان و حیوان قرار دارد و به ۳ فرم لیشمانیوز پوستی، احشایی و پوستی- مخاطی بروز می‌کند. شایع‌ترین فرم پوستی به ۲ صورت خشک یا شهری و مرطوب یا روستایی مشاهده می‌شود که عامل آن‌ها به ترتیب *لیشمانیا تروپیکا (L.tropica)* و *لیشمانیا ماژور (L.major)* می‌باشند. عامل بیماری لیشمانیوز یک انگل تک‌یاخته‌ی داخل سلولی اجباری از جنس *لیشمانیا* است. این انگل برحسب محیط زندگی خود به دو شکل بدون‌تاژک (آماستیگوت) و تاژک‌دار (پروماستیگوت) دیده می‌شود. شکل بدون‌تاژک این انگل در بدن مهره‌داران و در سلول‌های تک‌هسته‌ای بیگانه‌خوار رشد و تکثیر می‌یابد، اما نوع دارای تاژک آزاد، در بدن پشه خاکی و محیط‌های کشت مصنوعی یافت می‌شود(Mougneau,et al., 2011).

امروزه با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در علم پزشکی و به ویژه در کنترل بیماری‌های عفونی حاصل شده است، هنوز هم برخی از بیماری‌های عفونی به عنوان یکی از معضلات بهداشتی در نظر گرفته می‌شوند. سازمان جهانی بهداشت به دلیل اهمیت بهداشتی، این بیماری را در ردیف ۶ بیماری حائز اهمیت در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری معرفی نموده است(Adler,1964). لیشمانیوز را می‌توان از لحاظ بالینی به سه دسته لیشمانیوز جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی تقسیم کرد که فرم جلدی آن شایع‌تر بوده و در برخی از کشورها از قبیل ایران به وفور یافت می‌شود. گستردگی این بیماری در تمام قاره‌های جهان به جز استرالیا مشهود است. طبق اطلاعات سازمان جهانی بهداشت، ۱۲میلیون نفر در جهان به انواع مختلف لیشمانیوز مبتلا بوده و جمعیتی در حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلاء به این بیماری قرار دارند. سالیانه ۲-۱/۵ میلیون نفر به این انگل مبتلا شده که حدود ۵۰۰ هزار مورد از آن مربوط به لیشمانیوز احشایی و بقیه موارد لیشمانیوز پوستی و پوستی- مخاطی است (Desjeux,2004). در ایران لیشمانیوز پوستی از بیماری‌های مهم انگلی بوده و می‌توان گفت بعد از مالاریا مهم‌ترین بیماری منتقله توسط بندپایان است. در مناطق اندمیک به‌طور معمول کودکان بیشتر به این بیماری گرفتار می‌شوند، ولی در مناطق غیراندمیک در سنین مختلف مشاهده می‌شود. از آن جایی که لیشمانیوز جلدی یکی از اولویت‌های بهداشتی و پژوهشی سازمان جهانی بهداشت به خصوص در ارتباط با کشورهای در حال توسعه است، لذا در ایران نیز مورد توجه قرار گرفته است و در برنامه‌های پژوهشی متعددی و در جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد(Ivens, et al., 2005 and Alrajhi, et al., 2002).

در سال‌های اخیر به دلیل ظهور مقاومت علیه داروهای استاندارد که عمدتاً ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان می‌باشند، درمان لیشمانیوز با دشواری‌های فراوانی مواجه شده است. گزارش‌های پزشکان معالج حاکی از عود، عدم بهبود و یا تأثیر نامناسب این داروها در بیماران است و از طرف دیگر، این درمان‌ها به ویژه در مناطق روستایی به خاطر هزینه سنگین و عدم دسترسی به آن مناسب نیست. تحقیقات اخیر بر ترکیبات طبیعی گیاهی، اثرات ضدلیشمانیایی کینولین، آلکالوئیدها، ایزوکینولین آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، نفتوکینون‌ها و ترپن‌ها را در برخی از گونه‌های *لیشمانیا* نشان داده است. گیاهانی که دارای فلاونوئید، آلکالوئید و ترپنوئید هستند، خاصیت ضدالتهابی دارند(Singh,et al., 2014).

با توجه به اینکه مصرف داروهای صنعتی با عوارض جانبی زیادی همراه است، توجه به اهمیت گیاهان دارویی و تولید داروهایی از آن‌ها برای درمان بیماری‌ها پیوسته تأکید می‌شود. این گیاهان با داشتن ساختمان گسترده شامل سلول‌ها، پروتئین، قند، آنزیم و چربی دارای خاصیت درمانی بر روی انسان به دلیل مواد فعال درون خود می‌باشند(Kobets,et al., 2012). از این‌رو نیاز به استفاده از ترکیبات و داروهای ضدلیشمانیایی مؤثر، با سمیت کم، کم هزینه و همچنین با قابلیت تجویز به صورت خوراکی بیش از پیش احساس می‌شود. در همین راستا با توجه به تنوع گسترده آب و هوایی و گیاهی ایران، استفاده از گیاهان فلور طبیعی هر منطقه به عنوان منبع غنی عوامل دارویی ضدلیشمانیایی ضروری می‌باشد(Tajbakhsh,et al., 2021 and Minodier, et al., 2007).

ازجمله داروهای ضدلیشمانیایی که منشأ گیاهی دارد، می‌توان به آرتمیزینین اشاره کرد. آرتمیزینین یک ترپن است (*Artemisia annua*) لاکتون جدا شده از گیاه درمنه که به عنوان داروی ضدمالاریا و ضدلیشمانیا شناخته شده است(Zhan,et al., 2023). گیاه *Dracocephalum moldavica L* که به آن اژدهای سر مولداوی یا مومیایی مولداوی نیز گفته می‌شود، گیاهی است علفی و یک‌ساله، متعلق به خانواده *Lamiaceae* این گیاه بومی آسیای مرکزی است و در اروپا نیز یافت می‌شود. به طور سنتی برای درمان سردرد، معده، کبد و ناراحتی‌های قلبی عروقی استفاده می‌شود و هم‌چنین به عنوان افزودنی غذایی استفاده می‌شود. اژدهای سر مولداوی منبع خوبی از پروتئین‌ها، لیپیدها و فیبر است. روغن آن غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده (حدود ۹۰٪)، اساساً اسیدهای لینولنیک و لینولئیک است(Dastmalchi, et al., 2007 and Golparvar, et al., 2016).

عصاره و روغن حاصل از گیاه مولداوی به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی استفاده می‌شود. برگ‌های گیاه مولداوی حاوی پلی‌فنول‌های مختلف، به ویژه اسیدهای هیدروکسی سینینامیک و فلاونوئیدها، لوتئولین و گلیکوزیدهای آن‌ها شامل کوئرستین، دیوسمتین، کامپرول، آکاسیتین، آگاستاکیوزید و سالویژنین است. *Dracocephalum moldavica L* یک داروی سنتی محبوب است که در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد که دارای طیف گسترده‌ای از اثرات دارویی است. این گیاه یکی از مهم‌ترین و با ارزش‌ترین گیاهان دارویی و معطره بومی کشور به شمار می‌آید که سر شاخه‌های گل‌دار گیاه در طب سنتی و نوین کاربردهای دارویی متعدد گزارش شده است. هم‌چنین در تهیه‌ی عرقیات گرم، از سر شاخه‌های گل‌دار زرین گیاه همراه با سایر گیاهان دارویی نظیر نعنا، آویشن و گل محمدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بادرشبی به دلیل وجود ترکیب‌های فیتوشیمیایی باارزش، قرن‌هاست به عنوان داروی گیاهی در درمان بیماری‌های کلیوی و اختلالات کبدی تجویز می‌شود، علاوه بر این در سال‌های اخیر کاربرد گسترده‌ای در صنایع آرایشی- بهداشتی و غذایی پیدا کرده است. بذرها، حاوی ۲۹ - ۱۸ ٪ روغن زرد رنگ و معطر هستند که به طور متوسط ۹۰ ٪ این روغن از اسیدهای چرب غیر اشباع شامل آلفا-لینولنیک (α-Linolenic acid) ، لینوئیک (Linoleic acid)، اولئیک اسید (Oleic acid)، پالمتیک اسید (Palmitic acid)، استئاریک اسید(Stearic acid) تشکیل شده است. بذرها هم‌چنین حاوی ۲۲-۱۷ ٪ پروتئین، حدود ۳۰٪ فیبر خوراکی قابل حل، ۲۵٪ نشاسته و ۱۶-۱۰٪ موسیلاژ هستند. بذر بادرشبی حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی نیز است که همین موضوع

ارزش قابل توجه آن را به عنوان ماده خام تهیه مکمل‌های غذایی، مشخص می‌کند.

تحقیقات زیادی در مورد شناسایی ترکیب‌های مؤثره عصاره‌های گیاهی و هم‌چنین بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ... انجام شده است، به طوری که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی به شدت تحت تأثیر قطبیت حلال استفاده شده در فرآیند عصاره‌گیری قرار دارد. به همین دلیل انتخاب حلال و روش استخراج مناسب، بسیار مهم است. حلال مناسب معمولاً با توجه به هدف عصاره‌گیری، ظرفیت قطبی ترکیب‌های مورد نظر، قطبیت ترکیب‌های غیر ضروری، هزینه کل و همچنین ایمنی و سازگاری با محیط زیست انتخاب می‌گردد. عصاره‌گیری با حلال شیمیایی، به دلیل ارزان بودن و سهولت اجرا، رایج‌ترین روش استخراج ترکیب‌های فیتوشیمیایی است. به علت سمّیت بالای بسیاری از حلال‌ها، مانند متانول و کلروفرم، بیشتر محققان برای استخراج ترکیب‌های فنلی از حلال‌های بی‌خطر مانند اتانول و آب استفاده می‌کنند(Acimovic,et al., 2022 and Aslanipour, et al., 2017). این گیاه از گونه‌های بومی ایران می‌باشد اما تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است. با توجه به گزارش‌ها و شواهد موجود از تاثیر گیاه مذکور بر برخی عفونت‌های میکروبی و تک‌یاخته‌ای و داشتن خاصیت ضدقارچی، در این مطالعه اثر ضدلیشمانیایی عصاره گیاه *Dracocephalum moldavica L.* بر روی پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* با اندازه‌گیری به روش رنگ سنجی (MTT) مورد ارزیابی قرار گرفته است(Aslanipour, et al., 2017).

مواد و روش کار

تهیه و آماده‌سازی گیاه

گیاه بادرشبی از گونه‌های بومی ایران می‌باشد اما تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است و از ارومیه خریداری شده است. در این مطالعه اندام هوایی گیاه از هرباریوم گیاهی آن منطقه و در شرایط بدور از نور خورشید جداسازی و به آزمایشگاه مرجع منتقل گردید. برای جلوگیری از تماس مداوم جریان هوا و عوامل طبیعی، آسیاب کردن نمونه‌ها بلافاصله کمی قبل از عصاره‌گیری انجام شد. گیاه مورد مطالعه پس از جمع‌آوری توسط متخصص گیاه شناسایی شده و یک نمونه از گیاه در پژوهشکده گیاهان دارویی ثبت و نگهداری می‌شود. غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها و ترکیبات مؤثره برای تهیه غلظت‌های مختلف از اسانس و عصاره‌ها غلظت‌های مختلف تهیه می‌شود.

تهیه‌ی عصاره و فراکسیون‌های مختلف گیاه

برای عصاره‌گیری، پودر گیاه تهیه شده در ۸ ظرف به یک میزان ریخته و به‌طور کامل فشرده شد. در هر ظرف حدود ۴۰۰ لیتر حلال ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد تا تغلیظ انجام گردد. ظرف‌ها پس از ۴۸ ساعت خارج، صاف و به مدت ۲۴ ساعت درب شیشه‌ها باز و درون آون گذاشته شد تا تغلیظ و ته نشست پیدا کند(Mehsa, et al., 2020).

تهیه، تکثیر و فریز سلول‌های رده J_{774}

سلول‌های (J_{774} (Murine macrophage cell line با کد C483ثبت شده در ایران از بانک سلولی خریداری شد. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی (GIBCO- America) FBS 10%کشت داده شدند. جهت تکثیر، سلول‌ها را در انکوباتور سلولی قرار داده دادیم تا به تعداد مناسب سلول‌ها تکثیر پیدا کنند. تعویض محیط سلول‌ها هر سه روز یکبار

انجام گرفت. برای انجام کشت سلولی، سلول‌ها در ظرف بزرگتر ریخته شدند، به منظور تکثیر سلولی ابتدا محیط قبلی سلول‌ها کاملاً تخلیه شد. سلول‌ها با یک میلی‌لیتر بافر PBS 1X شستشو داده شدند تا کل سرم موجود تخلیه شود. سپس یک میلی‌لیتر از محلول Trypsin-EDTA (Sigma-German) (تریپسین ۰/۲۵ درصد و یک میلی‌مولار EDTA) در هر ول ریخته شد و به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها از کف ظرف جدا شوند. سپس کل محلول تریپسین حاوی سلول‌های جدا شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شد و با اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی FBS 10% تریپسین آن مهار و به مدت ۵ دقیقه در RPMI ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ در یک میلی‌لیتر محیط کشت سوسپانس گردید و سوسپانس سلولی در فلاسک T_{75} کشت داده شد (Murray, 1981).

جهت تهیه ذخیره سلولی از سلول‌های J_{774}، سلول‌ها از کف ظرف جدا شد و بعد از انجام سانتریفیوژ، رسوب سلولی بدست آمده از یک فلاسک در ۱ میلی‌لیتر محیط فریز حاوی FBS 90% و DMSO 10% (CATNO:BP231-100) سوسپانس شد. پس از توزیع در کرایوویال‌های مخصوص فریز به تانک ازت مایع منتقل گردید(Geroldinger, et al., 2019).

تهیه و تکثیر انگل *لیشمانیا ماژور*

سویه استاندارد *لیشمانیا* اصلی ایران (MHOM/IR/75/ER)از آزمایشگاه انگل شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سپس انگل‌ها به لوله‌های حاوی محیط NNN (Novy-MacNeal-HIMEDIA) (Nicolle، هندوستان) دوفازی منتقل و به مدت پنج روز انکوبه شد و پس از تهیه لام و مشاهده پروماستیگوت متحرک، اطمینان از رسیدن انگل به فاز لگاریتمی رشد، برای تکثیر بیشتر در محیط کشت $RPMI_{1640}$ پاساژ داده شد. فرم‌های پروماستیگوت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نسبت تجمعی پروماستیگوت‌ها هر ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. تعداد پروماستیگوت‌ها در ۱۰ میکرولیتر با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش شد. برای سنجش سمیت عصاره بر روی پروماستیگوت با لام نئوبار و شمارش پروماستیگوت‌ها جمعیت سلولی ارزیابی شد(Rasti, et al., 2016).

بررسی اثر سمیت عصاره بر سلول ماکروفاژ (CC_{50})

سلول‌های ماکروفاژ (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) DMEM محیط کشت را در محتوی ٪۱۰-۱۵ بافر فسفات‌سالین و ٪۱-۵/۱ پنی‌سیلین استرپتومایسین در فلاسک‌های ۵۰ سی‌سی ریخته و در انکوباتور ۳۷ درجه که همراه با ٪۵ دی اکسیدکربن است، قرار داده شد. هر روز یا یک روز در میان محیط کشت رویی را با محیط کشت جدید عوض کرده و بعد از چند روز سطحی که همیشه بر روی صفحه انکوباتور قرار دارد، مملو از ماکروفاژهای چسبیده به سطح خواهد بود. وقتی تمام سطح فلاسک از ماکروفاژهای چسبیده انباشته شد، در زیر هود با تیغه اسکرچر و یا نوک سمپلر ماکروفاژهایی که به جدار داخلی فلاسک چسبیده‌اند را جدا کرده به طوری‌که جدار فلاسک شفاف گردیده که حاکی از کنده شدن ماکروفاژها می‌باشد(Ilaghi, et al., 2021).

کمی محیط کامل داخل فلاسک ریخته و شستشو داده شد تا تمام ماکروفاژهای کنده شده داخل مایع قرار گیرند، سپس محلول داخل فلاسک به لوله فالکون منتقل گردید و با

۴۵۰۰-۱۱۰۰ دور در هر دقیقه (RPM) به مدت۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و لوله به آرامی تکان داده شد تا سلول‌ها از ته لوله کنده شوند. حجم لوله با محیط کامل به ۱ سی‌سی رسید و خوب مخلوط گردید و به شمارش ماکروفاژها پرداخته شد. به منظور تعیین اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌ها سلول‌های J_{774} (5×10^6) در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (1, 10, 100, 1000, 2000 µg/ml) در پلیت‌های کشت میکرولیتری ۹۶ چاهک کشت شد(Junsi, et al., 2017 and Garcia, et al., 2017). در ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بقای سلولی با استفاده از روش رنگ‌سنجی متیل تیازول تترازولیوم (MTT)اندازه‌گیری شد. نسبت جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با نمونه PBS و آمفوتریسین B با غلظت (µg/ml) به عنوان شاهد مورد ارزیابی گردید. این نتایج به عنوان میانگین درصد کاهش ماکروفاژها در مقایسه با نمونه‌های شاهد تیمار نشده ۱۰۰× نشان داده شد. در نهایت، غلظت ایجاد کننده سمیت سلولی µg/ml (CC_{50}) ۵۰٪ تعیین شد(Junsi, et al., 2017).

بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر روی پروماستیگوت‌ها (IC50)

اثرات افزایش غلظت عصاره‌ها (۱ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بر فاز ثابت پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* (2.5×10^6 انگل در واحد میلی‌لیتر) ۲۵۰ هزار به ازای ۱۰۰میکرولیتر در هر چاهک ۹۶ خانه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. حساسیت با استفاده از روش رنگ سنجی MTT در ۲۴ و ۴۸ ساعت تعیین شد و غلظت عصاره که منجر به مهار ۵۰ درصدی رشد پروماستیگوت‌ها (µg/ml) تخمین زده شد(Ilaghi, et al., 2021 and Dutta, et al., 2005).

بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر روی ماکروفاژهای آلوده توسط *لیشمانیا ماژور* (EC_{50})

برای آلودگی ماکروفاژها توسط انگل، یک پلیت ۹۶ چاهکی در ۵٪ CO_2 به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا به ماکروفاژها اجازه چسبندگی داده شود. پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در $RPMI_{1640}$ با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (pH 7.4)کشت داده شد. پس از رسیدن به فاز رشد ثابت، از آن‌ها برای آلوده کردن ماکروفاژهای J_{774} استفاده شد(Najm, et al., 2021). به هر اسلاید محفظه و ۹۶ چاهک با نسبت انگل به سلول میزبان ۱:۱۰ انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بلافاصله پس از آن، پروماستیگوت‌های آزاد با سه بار شستشو با استفاده از محیط بدون سرم $RPMI_{1640}$ حذف شدند. در نهایت، ماکروفاژهای آلوده با افزایش غلظت عصاره‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵٪ CO_2 تیمار شدند. چاهک‌های حاوی محیط کشت و انگل بدون دارو به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. در نهایت، تست رنگ سنجیMTT زنده بودن سلول را اندازه‌گیری کرد(Alves, et al., 2017). داده‌ها به عنوان درصد سلول‌های مرده در کشت‌های تیمار شده با عصاره‌ها، آمفوتریسین B و مقایسه با ماکروفاژهای تیمار نشده نشان داده شد. علاوه بر آمار توصیفی از آزمون‌های ANOVA ، توکی، کروسکال والیس و کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Prism مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شمارش سلول ماکروفاژ، پروماستیگوت و آماستیگوت تقسیم در تستMTT

پس از کشت سلول‌ها و بررسی با میکروسکوپ Invert بعد از رسیدن به رشد کافی و تلاقی ۸۰٪ برای سلول ماکروفاژ، ابتدا کف فلاسک با PBS استریل شستشو داده شد و با پیپتینگ ماکروفاژها از کف فلاسک جدا شد. پس از سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ RPM به مدت ۵ دقیقه مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد با اضافه کردن محیط تازه در حضور تریپان‌بلو با استفاده از لام نئوبار ضمن بررسی زنده بودن ماکروفاژها، شمارش آن‌ها با لام نئوبار انجام شد(Ilaghi, et al., 2021 and Mendonça, et al., 2018). بدین ترتیب که به میزان یک دهم حجم، تریپان‌بلو (۰/۴ درصد) به سوسپانسیون ماکروفاژ اضافه شد و با لام نئوبار در زیر میکروسکوپ با عدسی شیئی ۱۰ بررسی ماکروفاژهای زنده و شمارش نیز انجام شد. تریپان‌بلو به عنوان یک رنگ حیاتی به داخل سلول‌های مرده نفوذ کرد در نتیجه سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده به صورت بیرنگ دیده شدند. برای شمارش پروماستیگوت نیز ۱۰ میکرولیتر از انگل در زیر لام نئوبار شمارش شد. در هر سه سری سلول ماکروفاژ، ماکروفاژ حاوی آماستیگوت و پروماستیگوت شمارش به صورت زیر انجام شد. شمارش در ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای لام در زیر میکروسکوپ Invert انجام شد. در نهایت عدد حاصله در عکس ضریب رقت (۱۰) و حجم (10^4) ضرب شد تا تعداد سلول در هر میلی‌لیتر بدست آمد(Bezerra, et al., 2020).

روش سنجش DPPH

از محلول DPPH ۱۰۰۰ میکرولیتر با ۸۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl (pH = 7.4) در یک لوله آزمایش اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نمونه آزمایشی اضافه شد و به سرعت مخلوط گردید. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. محلول مخلوط با ۱۲۰۰ میکرولیتر اتانول و ۸۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl(pH = 7.4) به عنوان بلانک استفاده شد(Sifaoui, et al., 2014).

نتایج

اثر ضدلیشمانیایی عصاره گیاه بادرشبی بر پروماستیگوت خارج سلولی *لیشمانیا ماژور*

از سوسپانسیون‌های انگل *لیشمانیا ماژور* که حاوی ۱×۱۰۶ سلول انگلی در هر میلی لیتر که در فاز لگاریتمی رشد هستند را به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل به صورت سه بار تکرار اضافه گردید و به مدت ۶ ساعت انکوبه شد. رقت‌های مختلف از عصاره و داروی کنترل را تهیه و به میزان ۱۰ µl از آن را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت تریپلیکیت اضافه شد. علاوه بر این از شاهد (بلانک) که حاوی فقط ۱۰۰ µl محیط کشت فاقد پروماستیگوت یا دارو است، استفاده می‌شود. همچنین به دو چاهک دیگر فقط پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* به عنوان کنترل اضافه می‌شود و میکروپلیت‌ها را در زمان‌های مختلف در شرایط انکوباسیون قرار می‌گیرند. بعد اتمام زمان انکوباسیون، میکروپلیت‌ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ RPM سانتریفوژ و محلول رویی را جدا و به باقی‌مانده ۲۰µl از محلول MTS کار به هر چاهک اضافه نمودیم. متعاقباً بعد از انکوباسیون و سانتریفوژ کردن آن محلول رویی را جدا و بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری را با دستگاه الایزا ریدر مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس میزان غلظتی که ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌ها را طی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت مهار می کند (IC_{50})، محاسبه می‌گردد.

هم‌چنین اثر حفاظتی عصاره بادرشبی بر تکثیر ماکروفاژها در ۸ حلال مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج CC_{50} در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصل از آن در جدول ۱ ارائه شده است. همان طور که مشخص است نتایج در ۴۸ ساعت کاهش یافته است. برای مشاهده تغییرات مورفولوژیک سلول‌های تیمار شده یا تیمار نشده با IC_{50}عصاره بادرشبی، ابتدا پروماستیگوت‌ها در دور پایین g ۱۰۰۰ و برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند و سپس ماده رویی دور ریخته شد و باقی‌مانده آن در محلول PBS به صورت سوسپانسیون در آمده و سپس سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و در بزرگنمایی ۱۰۰ × و در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بررسی اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات مؤثره بر سلول‌های شبه ماکروفاژ و پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* طی ۲۴ و ۴۸ ساعت در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. همچنین نتایج حاصل از بررسی مقایسه‌ای تعداد پروماستیگوت/آماستیگوت به تنهایی و در مجاورت با رده سلولی J_{774} ماکروفاژ در حضور عصاره/فراکسیون‌های مختلف گیاه در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. میزان آماستیگوت در همه فراکسیون‌های گیاهی طی ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌طور قابل توجهی کاهش داشته است ($P<0.0001$). درصد حرکت پروماستیگوت بعد از درمان با آمفوتریسین B در جدول ۳ نشان داده شده است.

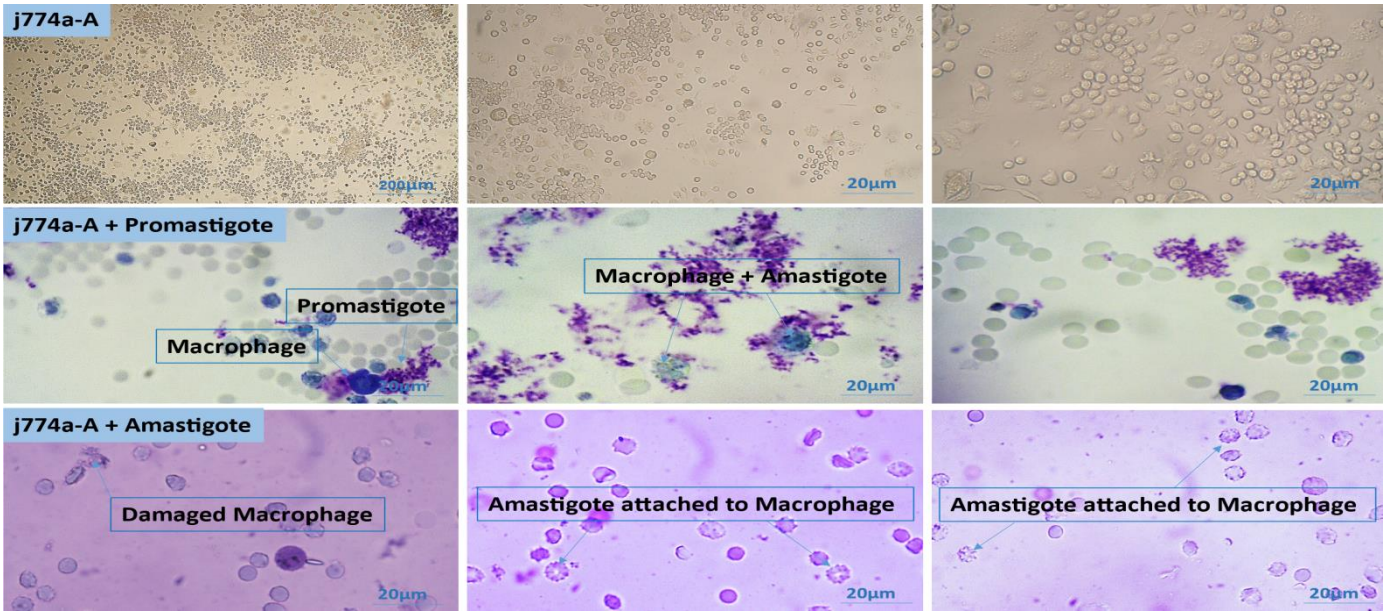
جدول ۱: بررسی اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات موثره بر سلول های شبه ماکروفاژ و پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور*

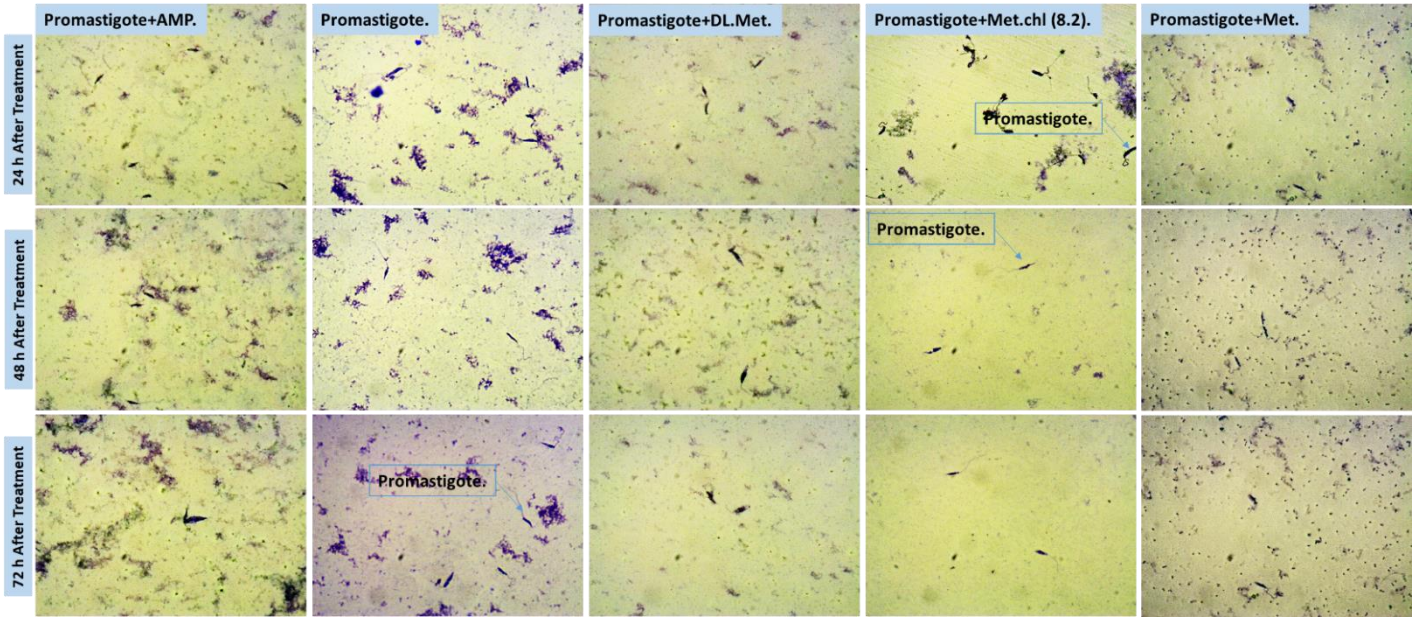
شاخص	ماکروفاژ (۲۴ ساعت)	پروماستیگوت (۲۴ ساعت)		آماستیگوت (۲۴ساعت)		عصاره/فراکسیون گیاه
(Selectivity Index)	CC_{50} (µg/mL)	*P*-value	IC_{50} ± SD (µg/mL)	*P*-value	IC_{50} ± SD (µg/mL)	
3.1	501.03±207.77	0.0201	160.57± 27.98	< 0.0001	42.44±0.65	کلروفرم
2.2	655.43±206.66	0.1040	298.37±163.80	< 0.0001	39.06±0.06	کلروفرم-هگزان (۱:۱)
7.2	946.40±172.19	0.0099	131.77±11.77	< 0.0001	48.83±1.74	دی کلرو متان
2.3	505.97±167.28	0.2332	220.18±148.34	< 0.0001	39.92±4.44	متانول ۸۰درصد
1.5	329.00±138.11	0.0014	215.93±25.47	< 0.0001	28.85 ±0.41	متانول-کلروفرم (۸:۲)
1.4	270.20±65.36	0.0166	186.67±37.78	< 0.0001	45.13±1.18	هگزان
1.9	447.33±37.05	0.2699	229.9±175.9	< 0.0001	38.07±0.98	متانول-کلروفرم (۱:۱)
2.5	442.77±200.23	0.0254	179.6±39.6	< 0.0001	26.07±0.55	متانول

جدول ۲: بررسی اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات موثره بر سلول های شبه ماکروفاژ و پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور*

عصاره/فراکسیون گیاه	آماستیگوت (۴۸ساعت)		پروماستیگوت (۴۸ ساعت)		ماکروفاژ (۴۸ ساعت)	شاخص
	IC_{50} ± SD (µg/mL)	*P*-value	IC_{50} ± SD (µg/mL)	*P*-value	CC_{50} (µg/mL)	(Selectivity Index)
کلروفرم	36.83±0.54	< 0.0001	136.03±45.40	0.2415	612.27±347.51	4.5
کلروفرم-هگزان (۱:۱)	37.76±0.47	< 0.0001	106.52±56.81	0.8522 (ns)	529.53±275.07	5.0
دی کلرو متان	41.31±1.76	< 0.0001	141.99±60.93	0.2988 (ns)	548.77±430.21	3.9
متانول ۸۰درصد	36.26±1.37	< 0.0001	57.96±29.59	0.0699 (ns)	318.20±147.69	5.5
متانول-کلروفرم (۸:۲)	28.14±0.62	< 0.0001	64.09±30.99	0.1157 (ns)	178.79±102.07	2.8
هگزان	43.38±1.51	< 0.0001	86.20±66.28	0.7368 (ns)	140.96±74.20	1.6
متانول-کلروفرم (۱:۱)	37.45±0.57	< 0.0001	91.0±65.6	0.8241 (ns)	506.87±334.56	5.6
متانول	24.58±1.01	< 0.0001	67.41±44.51	0.2737	184.34±137.17	2.7

شکل ۱: بررسی مقایسه ای رده سلولی J_{774} ماکروفاژ، به تنهایی و در حضور پروماستیگوت و آماستیگوت





شکل ۲: بررسی مقایسه‌ای تعداد پروماستیگوت /آماستیگوت به تنهایی و در حضور عصاره/فراکسیون های مختلف گیاه

جدول۳: بررسی درصد حرکت پروماستیگوت بعد از درمان *لیشمانیا ماژور* با آمفوتریسین B

حرکت/عصاره	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت	
دی کلرو متان	Live-Medium motility	63±1 <0.0001	Low mobility	47±2 < 0.0001	Live & low mobility	23±3 < 0.0001
متانول-کلروفرم (۸:۲)	Live	84±2 0.034	Low mobility	72±2 0.0024	Dead	42±6 0.0009
متانول ۸۰درصد	Live-Medium motility	69±5 0.0033	Low mobility	49±1 < 0.0001	Dead	1±1 < 0.0001
آمفوتریسینB	Low mobility	43±3 < 0.0001	Dead	10±2 < 0.0001	Dead	1±1 < 0.0001

اثر سمیت عصاره و ترکیبات مؤثره بر سلول های شبه ماکروفاژ رده سلولی (CC_{50}) J_{774}

به منظور تعیین اثرات سیتوتوکسیک عصاره/فراکسیون‌های گیاه، سلول‌های J_{774} ۵×۱۰^{۴} در حضور غلظت‌های مختلف عصاره، در پلیت‌های کشت ۹۶ چاهکی کشت شدند. در ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای

۳۷ درجه سانتی‌گراد بقای سلولی با استفاده از روش رنگ سنجی متیل تیازول تترازولیوم (MTT) اندازه‌گیری شد. این نتایج به عنوان میانگین درصد کاهش ماکروفاژها در مقایسه با نمونه‌های شاهد تیمار نشده را نشان خواهد داد. از آزمون MTTطبق پروتکل مربوطه استفاده می‌شود. سلول‌های لاین J_{774} در پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول اضافه می‌شوند و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند و سپس در حضور غلظت‌های مختلف اسانس برای ۲۴ ساعت قرار می‌گیرند. از ماکروفاژ و RPMI به عنوان کنترل استفاده می‌شود. مجموعه تست و کنترل به صورت سه بار تکرار انجام می‌شود. در روش MTT میزان رنگ تولید شده در چاهک‌ها با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر، جذب نوری قرائت شده و با سلول‌های کنترل زنده مقایسه می‌شوند.

در جدول ۴ غلظت ایجادکننده سمیت سلولی (µg/ml) ۵۰ درصد (CC_{50}) تعیین و نشان داده شده است. مقادیر CC_{50} با استفاده از نرم افزار Prism 8.0 محاسبه شد.

جدول۴: مقایسه اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات موثره بر سلول های شبه ماکروفاژ *لیشمانیا ماژور*

عصاره/فراکسیون گیاه	آماستیگوت (24h)	آماستیگوت (48h)
	CC_{50} (µg/mL)	CC_{50} (µg/mL)
کلروفرم	621.9	550.5
کلروفرم-هگزان (۱:۱)	641.2	483.2
دی کلرو متان	311.6	156.2
متانول ۸۰درصد	435.2	440.5
متانول-کلروفرم (۸:۲)	492.8	293.9
هگزان	410.5	153.1
متانول-کلروفرم (۱:۱)	266.5	124.7
متانول	918.3	418.5
آمفوتریسینB	10	10

اثر سمیت عصاره و ترکیبات مؤثره بر روی آماستیگوت داخل سلولی *لیشمانیا ماژور*

اثر عصاره گیاه بر تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای آلوده ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف عصاره و فراکسیون‌های گیاه ، قادر به مهار قابل توجهی از تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای آلوده در مقایسه با شاهد درمان آمفوتریسین B بودند ($P<0.0001$). ارزیابی نتایج حاضر نشان دهنده کاهش چشم‌گیر تعداد آماستیگوت داخل سلولی به ویژه در حضور حلال متانولی ($P<0.0001$)، نسبت به سایر حلال‌های فراکسیون گیاه است.

جدول۵: مقایسه اثر سمیت عصاره و ترکیبات موثره بر روی آماستیگوت داخل سلولی *لیشمانیا ماژور*

غلظت‌ها (µg/mL)	کلروفرم		کلروفرم-هگزان (۱:۱)		دی کلرو متان		متانول		متانول-کلروفرم (۸:۲)	
	Mean ± SD (µg/mL)	*P* value	Mean ± SD (µg/mL)	*P* value	Mean ± SD (µg/mL)	*P* value	Mean ± SD (µg/mL)	*P* value	Mean ± SD (µg/mL)	*P* value
150	996±5	0.1018	985±15	0.1309	972±24	0.1005	607±17	< 0.0001	948±64	0.2247
200	870±15	0.0001	855±49	0.0069	640±106	0.0041	567±24	< 0.0001	840±79	0.024
300	787±19	< 0.0001	642±39	< 0.0001	604±15	< 0.0001	516±23	< 0.0001	261±41	< 0.0001
400	453±82	0.0003	431±11	< 0.0001	578±65	0.0004	399±20	< 0.0001	265±15	< 0.0001
500	330±45	< 0.0001	305±16	< 0.0001	549±32	< 0.0001	342±65	< 0.0001	163±14	< 0.0001

بحث

لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای است که توسط گونه‌های انگل *لیشمانیا* و گزش پشه خاکی ماده ایجاد می‌گردد. این انگل داخل سلولی اجباری دارای چرخه زندگی پیچیده‌ای از نظر ژنتیکی است که نیاز به یک میزبان مهره‌دار و هم‌چنین یک حشره دارد تا به ترتیب به فرم‌های آماستیگوت یا پروماستیگوت وجود داشته باشند. انگل *لیشمانیا* در خون و بافت زندگی می‌کند، در بدن مهره‌داران درون سلول‌های بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای به شکل آماستیگوت و در بدن پشه خاکی و محیط کشت به صورت خارج سلولی و به شکل پروماستیگوت دیده می‌شود. داروهای مختلفی برای درمان لیشمانیوز وجود دارد، اما سمیت و عوارض جانبی آن‌ها و ایجاد مقاومت دارویی از مهم‌ترین مشکلات استفاده از این داروهاست. طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی، امروزه بیش از ۸۰٪ مردم جهان (نزدیک به ۵ میلیارد نفر) برای درمان بیماری‌ها هنوز از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. تقریباً ۴۳٪ داروهای تهیه شده در دنیا داروهایی با منشاء گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان عصاره‌گیری شده‌اند و یا بر اساس ترکیب گیاهی سنتز شده‌اند.

گیاهان به طور واضح به عنوان منبع بالقوه ضد تک‌یاخته‌ای هستند. فعالیت بیولوژیک عصاره گیاهان، به ترکیبات متعلق به چند گروه شیمیایی متعدد شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، استروئیدها و ... می‌باشد، که به گیاه خواص ضد باکتریایی، ضد انگلی و آنتی اکسیدانی می‌دهد. از جمله این گیاهان دارویی *Dracocephalum moldavica L* (گیاه بادرشبی) است که با وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصاره گیاه جای تحقیق و مطالعه بیشتر بر روی گیاه را باز می‌کند زیرا که ترکیبات فلاونوئیدی دارای ویژگی‌های بسیاری هستند. تاکنون مطالعه‌ای دقیق، جهت تأیید اثر ضد لیشمانیایی گیاه بادرشبی انجام نشده است. در ایران مطالعات متعددی از این روش رنگ سنجی جهت بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های گیاهی، به دلیل فوایدی ازجمله سادگی، سهولت، تکرار پذیری، ارزانی، ایمن و قابل اطمینان بودن، مورد استفاده

قرار گرفته است با توجه به گزارش‌ها و شواهد موجود از تأثیر گیاه بادرشبی بر برخی عفونت‌های میکروبی و تک‌یاخته‌ای، در این مطالعه سعی شد اثر ضد انگلی عصاره و فراکسیون‌های گیاه بادرشبی بر انگل *لیشمانیا ماژور* مورد بررسی قرار گیرد. در این مطالعه تاثیرات عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف زرین گیاه خراسانی گیاه به عنوان ترکیبات ضد لیشمانیایی در شرایط برون‌تنی ارزیابی شد. به دلیل اینکه بادرشبی جهت درمان بیماری‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است و دارای ترکیبات فعال موثر شناخته شده است و هم‌چنین تاکنون در ایران و سایر کشورها مطالعه‌ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است، این گیاه انتخاب شد تا در صورت داشتن خاصیت ضد لیشمانیایی، علاوه بر فعالیت ضدانگلی علیه *لیشمانیا ماژور* برای ترمیم ضایعه سالک نیز مورد استفاده قرار بگیرد. در زمینه استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری لیشمانیوز، تحقیقات زیادی در کشور ما و در نقاط مختلف دنیا انجام شده است(Sacks, et al., 2002). تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است. در ارتباط با سایر گیاهان و اثر عصاره آن‌ها روی انگل *لیشمانیا ماژور* مطالعات متعددی صورت گرفته است برای مثال :

احمد و همکاران تأثیر عصاره ۱۰ گیاه را روی شکل پروماستیگوت انگل مورد بررسی قرار داده و بیشترین تأثیر را مربوط به عصاره گیاه آویشن بیان نموده است(Ahmed, et al., 2011).

قادری و همکاران (۱۳۹۷) در مطالعه‌ای اثر ضد لیشمانیایی عصاره گیاهی آلفاپاینن را در شرایط آزمایشگاهی و موش حساس آزمایشگاهی *Balb/c* بررسی نمودند. نتایج به دست آمده نشان داد که استفاده از عصاره آلفاپاینن در شرایط برون‌تنی اثر ضد لیشمانیایی مناسبی بر روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* نشان داد و در شرایط درون تنی نیز بر روی موش حساس آزمایشگاهی باعث محدود شدن زخم گردید(Ghaderi, et al., 2018).

باقریان و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه تاثیر عصاره سیر بر روی آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* مطالعه درون‌تنی و برون‌تنی نشان دادند که عصاره سیر بر روی آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد، آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل *لیشمانیا* در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب را توصیه می‌نماید(Bagherian, et al., 2015).

ساداتی و همکاران (۱۳۸۸) در مطالعه‌ای تاثیر عصاره گیاه اکیناسهآ پورپورا بر لیشمانیوز جلدی در موش‌های آلوده به *لیشمانیا ماژور* را بررسی نمودند. در این مطالعه تجربی تعداد ۱۸ سر موش کوچک آزمایشگاهی به صورت تصادفی به سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول به مدت ۲ هفته عصاره هیدروالکلی گیاه اکیناسهآ پورپورا (۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) دریافت نموده سپس به انگل *لیشمانیا ماژور* آلوده شدند. گروه دوم ابتدا با انگل آلوده شده و پس از ایجاد زخم، به مدت ۲ هفته عصاره گیاه را دریافت نمودند. گروه سوم به عنوان گروه کنترل بدون دریافت عصاره به انگل *لیشمانیا* آلوده شدند. زخم‌های ایجاد شده ناشی از انگل لیشمانیا در سه ناحیه قاعده دم، پای راست و پای چپ هر موش در فواصل زمانی منظم اندازه‌گیری و ثبت شد و بر اساس این اندازه‌ها مساحت زخم‌های نواحی ذکر شده محاسبه گردید. داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری کروسکال-والیس تجزیه‌وتحلیل‌شدند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین میانگین اندازه زخم‌ها در گروه‌های اول و دوم با گروه کنترل وجود ندارد. با توجه به نتایج به دست

آمده می‌توان گفت که عصاره الکی گیاه اکیناسهآ پورپورا در غلظت ذکر شده قادر به کنترل رشد انگل *لیشمانیا ماژور* نمی‌باشد، هم چنین مصرف عصاره، قبل از تزریق انگل نیز مانع رشد انگل و ایجاد زخم نمی‌شود(Sadati, et al., 2011).

تامارگو و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه ارزیابی In vitro و In Vivo روغن به دست آمده *از Artemisia absinthium L* فرموله شده در نانو کوکلئات ها را بر لیشمانیوز جلدی بررسی نمودند. نتایج نشان داد که انکوکلئاسیون EO-Aa منجر به ایجاد یک فرمول ضد لشمانیایی پایدار و کارآمد بوده و با هدف یک استراتژی درمانی جدید برای درمان سالک می باشد(Tamargo, et al., 2017).

خامسی‌پور و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای فعالیت ضدلیشمانیایی زرین گیاه در محیط برون‌تنی و درون‌تنی انجام شد و مشخص شد که اسانس زرین گیاه نیز دارای خاصیت ضد توکسوپلاسمایی می‌باشد(Khamesipour, et al., 2020).

بصیرپور و همکارانش (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای مشخص شد اسانس زرین‌گیاه باعث کاهش عوارض ناشی از مالاریا می‌شود و میانگین دمای بدن موش‌های آلوده که تحت درمان زرین گیاه قرار گرفته بودند، پس از هفت روز کاهش معناداری داشت(Basirpour, et al., 2021).

حیدری و همکاران در سال ۲۰۱۹ با بررسی مطالعات پیشین گزارش کردند که *زرین گیاه* دارای خواص دارویی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد سرطانی، ضد درد، ضد هایپرلیپیدمیک، ضد گرفتگی، سیتوتوکسیک و تعدیل کننده ایمنی، است. هم‌چنین گزارش شده است که این گیاه برای دردهای التهابی، سردرد، احتقان، اختلالات کبدی، زخم، تب، درد کلیه، سوء هاضمه، درد معده، درد شکم، درد مفاصل، اسپاسم عضلانی و نفخ دارای اثرات درمانی بوده و در بهبود زخم نیز تأثیر داشته است. این بررسی نشان داد که زرین گیاه یک گیاه دارویی مهم با تعداد زیادی ترکیبات فعال و پتانسیل بالا برای حفظ سلامت انسان و دام در ایران است. با این وجود تاکنون مطالعه‌ای درباره‌ی اثرات ضد لیشمانیایی آن در ایران انجام نشده است(Heydari, et al., 2019).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص گردید که اثربخشی عصاره گیاه بر روی سویه استاندارد انگل *لیشمانیا ماژور* به روش رنگ سنجی MTTبررسی شد که نتایج نشان داد، عصاره/فراکسیون‌های گیاه *Dracocephalum moldavica L* با خواص ضد باکتریایی، ضد انگلی و آنتی اکسیدانی که به همراه دارد از بین آن‌ها اثربخشی غلظت عصاره متانولی گیاه موجب افزایش مهار رشد *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد و برای ترمیم زخم سالک با سمیت و عوارض کمتر می‌تواند مؤثر واقع شود. در این مطالعه درصد انگل‌های زنده در حضور غلظت‌های مختلف عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشبی پس از گذشت زمان‌های مختلف از کشت انگل کاهش چشمگیری داشتند. میزان IC_{50} عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشبی در زمان‌های مختلف در مهار *لیشمانیا ماژور* اثر چشمگیری نشان داد. امید است در کشورمان با تحقیقات بیشتر بر روی این گیاه مؤثر با داشتن خواص ضد لیشمانیایی کار شود تا بتوان بیماران مبتلا به سالک را با هزینه و درد کمتر و بهبودی بیشتر جای زخم‌ها درمان کرد.

منابع

1.
Mougneau, E., F. Bihl, and N. Glaichenhaus, *Cell biology and immunology of Leishmania.* Immunological reviews, 2011. 240(1): p. 286-296.
2. Adler, S., *Leishmania.* Advances in parasitology, 1964. 2: p. 35-96.
3. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives.* Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 2004. 27(5): p. 305-318.
4. Ivens, A.C., et al., *The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major.* Science, 2005. 309(5733): p. 436-442.
5. Alrajhi, A.A., et al., *Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major.* New England Journal of Medicine, 2002. 346(12): p. 891-895.
6. Singh, N., et al., *Natural product based leads to fight against leishmaniasis.* Bioorganic & medicinal chemistry, 2014. 22(1): p. 18-45.
7. Kobets, T., I. Grekov, and M. Lipoldova, *Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment.* Current Medicinal Chemistry, 2012. 19(10): p. 1443-1474.
8. Tajbakhsh, E., et al., *The effects of medicinal herbs and marine natural products on wound healing of cutaneous leishmaniasis: A systematic review.* Microbial Pathogenesis, 2021. 161: p. 105235.
9. Minodier, P. and P. Parola, *Cutaneous leishmaniasis treatment.* Travel medicine and infectious disease, 2007. 5(3 :(p. 150-158.
10. Zhan, M., et al., *Dracocephalum moldavica L.: An updated comprehensive review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and application aspects.* Fitoterapia, 2023: p. 105732.
11. Dastmalchi, K., et al., *Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (Dracocephalum moldavica L.) extracts.* LWT-Food Science and Technology, 2007. 40(9): p. 1655-1663.
12. GOLPARVAR, A.R., et al., *Chemical constituents of essential oil of Dracocephalum moldavica L. and Dracocephalum kotschyi Boiss. from Iran.* Acta Agriculturae Slovenica, 2016. 107(1): p. 25-31.
13. Acimovic, M., et al., *Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activity of Dracocephalum moldavica L.* Essential oil and hydrolate. Plants, 2022.1: Pp. 941.
14. Aslanipour, B., R. Heidari, and N. Farnad, *Phenolic Combination and*

Comparison of Antioxidant Activity in Three Different Alcoholic Extracts of Dracocephalum moldavica L. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 2017. 5(3: Pp. 199-206.
15. Mehsa, K.F., et al., Investigating the effect of cytotoxicity of the treated leaves extract of Badrashbi (Dracocephalum moldavica L.) using different inducers on four cancer cell lines. 2020.
16. Murray, H., *Interaction of Leishmania with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates.* The Journal of experimental medicine, 1981. 153(6): p. 1690-1695.
17. Geroldinger, G., et al., *Techniques to study phagocytosis and uptake of Leishmania tarentolae by J774 macrophages.* Experimental parasitology, 2019. 197: p. 57-64.
18. Rasti, S., et al., *Comparison of molecular, microscopic, and culture methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis.* Journal of clinical laboratory analysis, 2016. 30(5): p. 610-615.
19. Ilaghi, M., et al., *The potential role and apoptotic profile of three medicinal plant extracts on Leishmania tropica by MTT assay, macrophage model and flow cytometry analysis.* Parasite Epidemiology and Control, 2021. 12: p. e00201.
20. Junsi, M., et al., *Efficacy of Thunbergia laurifolia (Rang Jued) aqueous leaf extract for specific biological activities using RAW 264.7 macrophage cells as test model.* International Food Research Journal, 2017. 24(6): p. 2317-2329.
21. Garcia, A.R., et al., *Cytotoxicity and anti-Leishmania amazonensis activity of Citrus sinensis leaf extracts.* Pharmaceutical biology, 2017. 55(1): p. 1780-1786.
22. Dutta, A., et al., *Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis.* Parasitology international, 2005. 54(2): p. 119-122.
23. Najm, M., et al., *Anti-Leishmanial Activity of Artemisia persica, A. spicigera, and A. fragrance against Leishmania major.* Iranian journal of parasitology, 2021. 16(3): p. 464.
24. Alves, M.M.d.M., et al., *Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by Leishmania major.* Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2017. 390: p. 893-903.
25. Mendonça, D.V.C., et al., *Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum and Leishmania amazonensis and its mechanism of action against L. amazonensis species.* Parasitology research, 2018. 117: p. 391-403.
26. Bezerra ,E.A., et al., *Garcinielliptone FC: Selective anti-amastigote and immunomodulatory effects on macrophages infected by Leishmania amazonensis.* Toxicology in vitro, 2020. 63: p. 104750.
27. Sifaoui, I., et al., *Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of Leishmania species and their*

correlation with the antioxidant activity. Experimental parasitology, 2014. 141: p. 106-111.
28. Sacks, D. and N. Noben-Trauth, *The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice.* Nature reviews immunology, 2002. 2(11): p. 845-858.
29. Ahmed, S.B.H., et al., *Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia).* Natural product research, 2011. 25(12): p. 1195-1201.
30. Ghaderi, A., et al., *Evaluation of antileishmanial effect of the plant extract of alpha-pinene (Pistacia atlantica) in vitro and in vivo.* Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2018: (5)23. p.32-44.
31. Bagherian A, Abbaspour H, Saeidisar S, Mirzaei M, Mirzaei H R, Mirzaei H. The effect of garlic extract on Leishmania major Amastigotes: in vitro and in vivo studies . Research in Medicine 2015; 38 (4) :181-186.
32. Sadati M, Sarkari B, Asgari Q, Hatami S, Tavakl E. Effect of Echinacea purpurea on Control of Leishmania major Induced Cutaneous Leishmaniasis in Mice. armaghanj 2011; 16 (1) :31-40
33. Tamargo, B., et al., *In vitro and in vivo evaluation of essential oil from Artemisia absinthium L. formulated in nanocochleates against cutaneous leishmaniasis.* Medicines, 2017. 4(2): p. 38.
34. Khamesipour, et al., (2020) In vitro and in vivo Anti-Toxoplasma Activity of *Dracocephalum Kotschyi* Essential Oil. *Food Science Nutrition Published by Wiley Periodicals LLC*, no. 9: Pp. 522-31.
35. Basirpour, Bahare. Faham, Khamesipour. Mustafa, Ghanadian. Zahra, Ghayour, Najafabadi. Seyed Hossein, Hejazi. (2021). The Effect of *Dracocephalum Kotschyi* Essential Oil on Controlling the *Malaria* Complication in Mice Model. *Journal of isfahan Medical School* 40 (679): Pp. 517-23.
36. Heydari, P. Yavari, M. Adibi, P. Asghari, G. Ghanadian, S. M. Dida, G. O. Khamesipour, F. (2019). Medicinal properties and active constituents of *Dracocephalum kotschyi* and its significance in Iran: a systematic revie. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*

Investigating the protective effect of *Dracocephalum moldavica L* extract on induction of apoptosis and proliferation of *Leishmania major*

Mahnaz Karimi[1*], Elahe Tajbakhsh[2*], Hassan Momtaz[2]

1. 1. PhD student of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. 2. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

* Corresponding Authors:
karimimahnaz72@gmail.com
ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract:
Due to the prevalence of leishmaniasis in different regions of the world and Iran and considering that pentavalent compounds of antimony have many side effects for the treatment of the disease; the use of medicinal plants has been emphasized. This research was conducted in order to determine the effect of the extract of the medicinal plant *Dracocephalum moldavica L* on *Leishmania major* Amastigote in laboratory conditions by colorimetric method. In this experimental study, *Leishmania Major* standard strain was cultured in RPMI1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum FBS and penicillin-streptomycin antibiotics and until full growth at 37 degrees temperature and 5% CO_2 pressure in the incubator. It was kept in sterile conditions for 3-4 days. Then, in the stationary phase of growth, the effect of different concentrations of lemon balm plant extracts compared to the control drug on *Leishmania major* amastigote in laboratory conditions was investigated using the MTT colorimetric method. The percentage of live parasites in the presence of different concentrations of lemon balm extract and effective compounds decreased significantly after different times of parasite culture. The IC50 value of lemon balm extract and effective compounds at different times showed a significant effect in inhibiting *Leishmania major*.
Key words: Apoptosis, *Leishmania major*, lemon balm plant, proliferation.