Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The evaluation of Methanolic and aqueous extracts effect of *Zizyphus spina-Christi* against *Leishmania major* (MHOM/IR/75/ER) promastigotes using MTT assay

Sedigheh Albakhit[1], Shahram khademvatan[2], Monir Doudi[1]

1. Department of Microbiology, Falavarjan Branch,Islamic Azad University, Falavarjan,Isfahan, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center& Department of Medical Parasitology and Mycology Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/08/01
Accepted: 2016/01/23
Available online: 2016/10/16

Article Subject:
Medical Parasitology

IJMM 2016; 10(3):54-60

Corresponding author at:

Dr. Shahram khademvatan

Cellular and Molecular Research Center& Department of Medical Parasitology and Mycology Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Tel:: +984432770988

Email:

khademvatan@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Leishmaniasis is a zoonotic disease with high prevalence. Various medicines are used for treatment of Leishmaniasis but because of their side effects and drug resistance, the medical society seeks new effective compounds. The aim of this study was the evaluation of Zizyphus spina- Christi as source of new medicinal factor.

Materials and Methods: The methanolic extract was prepared by percolation method. *Leishmania major* promastigotes cultured at 25±2°C in stationary phase in RPMI-1640 medium complemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotic Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL). By using MTT assay, the biological activity of plant extracts was evaluated in comparison with Glucantime against *L.major* promastigotes and IC50 values (50% inhibitory concentrations) were also studied. All tests were repeated for three times.

Results: ***Zizyphus spina- Christi*** extracts and glucantime inhibited the growth of promastigote forms of *L.major* in vitro after 24, 48 and 72 hours of incubation. IC50 of glucantime was 21.96µg/ml, and IC50 values for methanol and the aqueous extracts of Zizyphus spina- *Christi* were 60 µg/ml and 80 µg/ml, respectively. All plant extracts had profound effects on promastigotes of *L.major*.

Conclusions: As regards, methanol and aqueous extract of Zizyphus spina-Christi have anti-leishmanial effects in vitro, further works are required to appraise the exact effect of these extracts on *Leishmania* agents in animal models.

KeyWords: Leishmania major, Zizyphus spina- Christi, plant extract, MTT

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Albakhit S, khademvatan S, Doudi M. The evaluation of Methanolic and aqueous extracts effect of *Zizyphus spina-Christi* against *Leishmania major* (MHOM/IR/75/ER) promastigotes using MTT assay. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (3):54-60

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۳ – مرداد و شهریور ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی اثر عصاره های متانولی و آبی گیاه " کنار "*Zizyphusspina Christi* بر پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* (MHOM/IR/75/ER) با روش MTT

صدیقه آلبخیت[۱]، شهرام خادم وطن[۲]، منیره دودی[۱]،

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی و گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۰۵/۱۰

پذیرش:۱۳۹۴/۱۱/۰۳

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۵

موضوع:

انگل شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(3): 54-60

نویسنده مسئول:

دکتر شهرام خادم وطن

گروه انگل شناسی و قارچ شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ایران

تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۰۹۸۸

پست الکترونیک:

khademvatan@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: لیشمانیوز بیماری زئونوز با شیوع بالا است. داروهای مختلفی برای درمان لیشمانیوز، به کار گرفته شده است اما عوارض جانبی آنها و مقاومت به دارو، باعث شده است که به دنبال ترکیبات جدید موثری باشیم. هدف این مطالعه ارزیابی گیاه " کنار " *Zizyphusspina Christi* به عنوان یک منبع دارویی بود.

مواد و روش کار: عصاره متانولی به روش پرکولاسیون و همچنین عصاره آبی آماده شد. پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* (MHOM/IR/75/ER) در دمای°C ۲±۲۵ در فاز ثابت در محیط RPMI ۱٦٤۰ غنی شده با سرم جنین گوساله (FCS) ۱۰٪ و آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین کشت داده شدند. سپس با استفاده از روش رنگ سنجی MTT، فعالیت بیولوژیکی عصاره گیاهی در مقایسه با گلوکانتیم روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* مورد بررسی قرار گرفت و مقدار IC۵۰ (که ۵۰٪ غلظت مهار کننده است) محاسبه گردید. همه تستها ۳ بار تکرار شدند. عصاره‌های متانولی وآبی *Zizyphusspina Christi* و گلوکانتیم از رشد پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاه بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت انکوباسیون جلوگیری بعمل آوردند.

یافته‌ها: IC۵۰ گلوکانتیم ۲۱/۹٦ میکروگرم بر میلی لیتر بود و IC۵۰ برای عصاره‌های متانولی و آبی گیاه " کنار " به ترتیب، ٦۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. همه عصاره‌ها دارای اثرات قابل ملاحظه‌ای روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه عصاره الکلی و آبی " کنار " دارای اثرات ضد لیشمانیایی در محیط آزمایشگاه می‌باشند، لزوم انجام آزمایشات بیشتر برای ارزیابی اثر این عصاره‌ها بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی احساس می‌شود.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، *Zizyphusspina Christi*، عصاره گیاهی، MTT

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

لیشمانیوز به طیفی از بیماری‌ها گفته می‌شود که توسط تک یاخته‌هایی از راسته کینتوپلاست داران و از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. تظاهرات بالینی این بیماری عفونی به اشکال جلدی، جلدی، مخاطی و احشایی دیده می‌شود. لیشمانیوز جلدی یا سالک در بسیاری از مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر وجود دارد. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال در حدود ۱۲ میلیون نفر مبتلا و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به این بیماری قرار دارند و سالیانه ۲ میلیون مورد جدید به ان اضافه می‌شود (۳-۱). داروهای خط اول در درمان لیشمانیازیس، ترکیبات آنتیموان ۵ ظرفیتی از جمله مگلومین آنتیمونات (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) می‌باشد. این ترکیبات با اثر بر روی آنزیم‌های انگلی به خصوص وقفه در آنزیم فسفوکنیاز باعث جلوگیری از تولید آدنوزین تری فسفات می‌شوند (۶-۴). در سال‌های اخیر افزایش میزان مقاومت به آنتی موان‌های ۵ ظرفیتی، عدم پاسخ به درمان، سمیت کلیوی و قلبی و هزینه بالای این داروها منجر به معرفی ترکیبات ضد لیشمانیایی جدیدی نظیر میلتوفوسین، آمفوتریسین B، میلتفوسین،

پاومایسین، کتوکونازول شده است. این داروها اغلب به دلیل هزینه بالا و عدم دسترسی، مقرون به صرفه نیستند (۸-۷).

در بسیاری از کشورهای در حال توسعه مردم توجه خاصی به استفاده از داروهای سنتی دارند. بر اساس گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی تقریباً ۸۰٪ مردم دنیا برای درمان بیماری‌های خود تمایل به استفاده از داروهای سنتی دارند. با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هر گونه عارضه هستند و همچنین در دسترس و ارزان می‌باشند درنتیجه استفاده از گیاهان بومی هرمنطقه با توجه به ترکیبات مؤثره آن‌ها می‌تواندبه عنوان منبع عوامل دارویی ضدلیشمانیایی محسوب شوند (۱۳-۹). اخیراًپیشرفت های زیادی در زمینه استفاده از داروهای گیاهی در زمان لیشمانیوز حاصل شده است. یکی از گیاهان، گیاه کنار (*Zizyphusspina Christi*) می‌باشد که خواص فارماکولوژیک و بیولوژیک متعددی به آن نسبت می‌دهند. طبق تحقیقات انجام شده گیاه کنار، دارای خواص ضددرد، آنتی اکسیدانی قوی، خواص ضد قارچ و ضد باکتری، ضد مالاریا و ضد شیستوزومیازیس را دارا می‌باشد (۱۷-۱۴). در بررسی فیتوشیمیایی عصاره گیاه کنار وجود آلکالوئید، فلانوئید، تانن، ساپونین گلیکوزید به مقدار زیاد ثابت شده است. مهم‌ترین ساپونین گلیکوزید موجود در عصاره برگ‌های گیاه کنار، کریستینین A می‌باشد (۱۸).

هدف از این تحقیق، تعیین اثرات ضد لیشمانیایی عصاره‌های متانولی و آبی استخراج شده از برگ‌های گیاه کنار (*Zizyphusspina Christi*) بر روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش تجربی در سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ روی سویه استاندارد انگل *لیشمانیاماژور* با کد (MRHO/IR/75/ER) تهیه شده از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

تهیه عصاره متانولی و آبی گیاه کنار

برگ گیاه کنار، از حومه شهرستان دزفول استان خوزستان در زمستان سال ۱۳۹۲ جمع آوری شد و نمونه هرباریومی آن برای شناسایی تهیه گردید. برگ‌های گیاه به منظور زدودن خاک و سایر آلودگی‌ها مورد شستشو قرار گرفتند و سپس در سایه و در دمای اتاق خشک شدند. بعد از آسیاب کردن برگ‌ها، عمل عصاره گیری به مدت ۴۸ ساعت به روش پرکولاسیون با متانول ۸۰٪ انجام شد. در پایان عصاره به دست آمده توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد و سپس عمل خشک کردن عصاره تغلیظ یافته توسط فور در دمای ۶۰-۵۰ درجه سلسیوس انجام شد. عصاره متانولی خشک شده تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تهیه عصاره آبی گیاه کنار به جای الکل از آب به جای حلال استفاده شد. عمل عصاره گیری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C انجام گرفت در طول این مدت ارلن حاوی مواد به منظور عصاره گیری بهتر، روی روتاتور قرار داشت. پس از سانتریفوژ، مایع رویی جدا شده و عمل خشک شدن آن در فور انجام شد.

تهیه و کشت پروماستیگوت ها

سویه استاندارد پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* تهیه شد. ابتدا پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS که قبلاً کمپلمان آن در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه غیر فعال شده و همچنین حاوی ۱۰۰IU/mL پنی سیلین و ۱۰۰ m/mLµ استرپتومایسین در دمای۱°C ± ۲۴ کشت داده شدند. با استفاده از لام هموسیتومتر تعداد پروماستیگوت هایی که در محیط کشت RPMI-1640 (فسفومتیل برومو) به فاز لگاریتمی رشد رسیدند در زیر میکروسکوپ شمارش و تعداد آنها به ۱×۱۰^{۶} تعدیل گردید و از آن جهت مطالعات استفاده شد (۱۹).

بررسی اثرات ضد لیشمانیایی گیاه کنار با روش رنگ سنجی MTT

برای تهیه محلول استوک MTT، ۵mg از پودر زرد رنگ MTT (SIGMA) در یک میلی لیتر PBS حل و در ۲۰°C - نگه داری شد. محلول کار روزانه به طور تازه با مخلوط کردن یک حجم از محلول استوک MTT با ۹ حجم محیط کشت RPMI-1640 دارای ۲/۵٪FCS تهیه و استفاده شد به طوریکه غلظت نهایی MTT ۰/۵ mg/ mL بود (۱۹،۲۰). پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* در فاز لگاریتمی به چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل افزوده شد. به طوری که در هر چاهک میزان ۱×۱۰^{۵} پروماستیگوت قرار گرفت. و به مدت ۶ ساعت انکوبه کرده، تا انگل به شرایط جدید عادت کند.

رقت‌های مختلف از داروی گلوکانتیم به عنوان داروی کنترل در ۱۰ غلظت مختلف (۱۱۴/۱، ۵۷/۰۹، ۲۸/۵، ۱۴/۲،

۷/۱، ۳/۵؛ ۱/۷۸، ۰/۸۸، ۰/۴۳ و ۰/۲۱) بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس رقت‌های مختلف از عصاره متانولی و عصاره آبی گیاه کنار در ۱۰ غلظت مختلف (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۵۲، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹، ۱/۹۵ و ۰/۹۷) بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد.

سپس جهت جلوگیری از آلودگی، عصاره‌ها فیلتر شدند. میزان ۱۰mg از عصاره‌ها و داروی کنترل به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت ۳ بار تکرار (Triplicate) اضافه شد. علاوه بر این از شاهد (بلانک) نیز استفاده شد. به این صورت که در یک چاهک پلیت، فقط ۱۰۰mL محیط کشت RPMI-1640 فاقد پروماستیگوت و یا دارو اضافه گردید. همچنین به ۲ چاهک دیگر فقط پروماسیتگوت های انگل به عنوان کنترل اضافه شد. و میکروپلیت ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط انکوباسیون قرار گرفتند. پس از پایان زمان‌های انکوباسیون ذکر شده، میکروپلیت ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰RPM سانتریفوژ کرده و محلول رویی را جدا کرده و به باقیمانده آن، ۲۰µg/mL از محلول کار آماده MTT(۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک افزوده شد. پس از انکوباسیون (۴-۳ ساعت) در دمای۲۵± ۲°C و سانتریفوژکردن، محلول رویی جدا شده و به منظور حل شدن کریستال‌های نامحلول فورمازان، ۱۰۰µL از حلال ایزوپروپانول (DMSO) به هر یک چاهک‌ها افزوده و به خوبی مخلوط شد و درنهایت بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، جذب نوری (Optical dencity, OD) را با دستگاه الایزاریدر در طول موج nm570(فیلتر رفرنس nm ۶۳۰) خوانده شد. سپس میزان IC50(Inhibitory concentration 50%) محاسبه گردید. IC50 غلظتی از عصاره است که از رشد ۵۰٪ از پروماستیگوت ها جلوگیری می‌کند (۲۱, ۲۰).

جدول ۱: IC50 های عصاره‌های گیاه کنار و داروی گلوکانتیم پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون علیه پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور*

نام ترکیب	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
عصاره متانولی گیاه کنار	µg/mL ۲۰۰	۶۰ µg/mL	۷۲ µg/mL
عصاره آبی گیاه کنار			۸۰ µg/mL
گلوکانتیم	۳۷ µg/mL	/۹۶µg/mL ۲۱	۱۴/۲۷µg/mL

بررسی تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت ها

برای مشاهده تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت های مجاور شده یا مجاور نشده با IC50 عصاره متانولی و آبی گیاه کنار، ابتدا سلول‌های پروماستیگوت در دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و ماده رویی به آرامی جدا شد و باقیمانده آن در محلول PBS به صورت معلق قرار گرفت. سپس سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰)و درزمان های مختلف ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند (۲۱, ۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم افزار EXCEL درصد زنده بودن سلول‌های انگل و سلول‌های کنترل مواجه شده با دارو با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

$$\%\text{Viable cells} + [([(A_T-A_B)/(A_C-A_B)\ 100]$$

در فرمول فوق A_C جذب نوری سلول‌های کنترل، A_T جذب نوری سلول‌های درمان شده با گیاه کنار و گلوکانتیم و A_B جذب نوری بلانک می‌باشد.

در نهایت نتایج به صورت IC50 به وسیله رگرسیون خطی با استفاده از نرم افزار EXCEL محاسبه شد. جذب نوری به دست آمده با تعداد سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیک رابطه مستقیم دارد (۲۱).

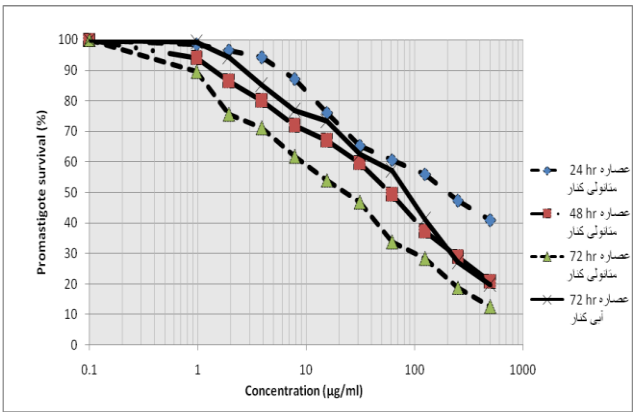
یافته‌ها

در این مطالعه اثرات سیتوتوکسیک و ضد لیشمانیایی عصاره‌های متانولی و آبی گیاه کنار در مقایسه با داروی کنترل گلوکانتیم بررسی شد. تغییرات جذب نوری به وسیله دستگاه الایزاریدر قرائت و روند تأثیر عصاره و دارو سنجیده شد.

آزمایش MTT نیز به منظور یافتن IC50 عصاره‌های گیاه کنار و داروی گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بر روی رشد پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج نشان می‌دهد که میزان IC50 عصاره متانولی و گیاه کنار در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۲۲،۶۰،۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر می‌باشد. همچنین IC50 برای عصاره آبی گیاه کنار در زمان ۷۲ ساعت برابر با ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. که این نشان دهنده فعال بودن

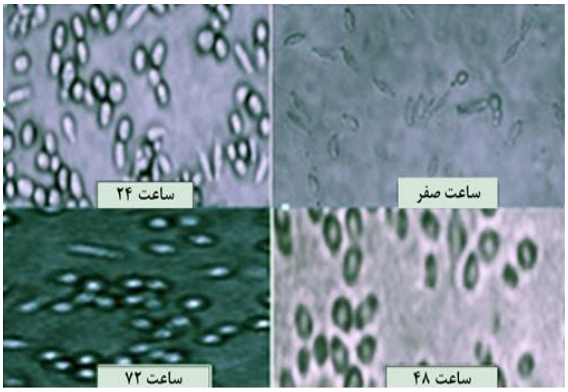
این عصاره‌ها علیه پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* سویه استاندارد می‌باشد. همچنین IC50 داروی کنترل گلوکانتیم نیز در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد زنده ماندن پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* در غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه کنار و داروی گلوکانتیم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در جدول ۱ نمایش داده شده است. در این جدول میزان IC50 عصاره‌های گیاه کنار و داروی کنترل گلوکانتیم نشان داده شده است. درصد زنده ماندن پروماستیگوت هایلیشمانیاماژوردرغلظت های مختلف عصاره متانولی گیاه کنار بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و عصاره آبی گیاه کناربعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در نمودار ۱ نمایش داده شده است. دراین نمودار میزان IC50 گیاه کنار نشان داده شده است.



نمودار ۱: درصد زنده ماندن پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* *درغلظت‌های* مختلف عصاره گیاه کنار بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و عصاره آبی گیاه کنار بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت ها:

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* مواجهه شده با غلظت ۲۲µg/mL (IC50) عصاره متانولی گیاه کنار و ۸۰µg/mL (IC50) عصاره آبی گیاه کنار بررسی شد. سلول‌های انگل پس از ۸ ساعت از مواجهه شدن با عصاره، تغییرات بروز کرده و در پایان ۷۲ ساعت، تمام سلول‌ها شروع به گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم (Cytoplasmic condensation) و چروکیدن (Cell shrinkage) و کوچک‌تر شدن کردند. قابل ذکر است که هیچ گونه تغییری در پروماستیگوت های کنترل مشاهده نشد. (شکل ۱)



شکل ۱: تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* در زمان صفر و ۷۲ ساعت پس از تیمار شدن با عصاره‌های متانولی و آبی گیاه کنار.

بحث و نتیجه گیری

لیشمانیوز یک معضل بهداشتی در اکثر کشورهای جهان به ویژه در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ایران محسوب می‌شود. بیش از ۷۰٪ موارد لیشمانیوز جلدی در ۱۰ کشور افغانستان، ایران، سوریه، برزیل، الجزیره، سودان، اتیوپی، کلمبیا، کاستاریکا و پرو رخ می‌دهد (۱).

داروهای مختلفی برای درمان لیشمانیوز وجود دارد، اما سمیت و عوارض جانبی آنها و ایجاد مقاومت دارویی از مهم‌ترین مشکلات استفاده از این داروهاست (۵،۸). 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 ۵۰٪ داروهای تهیه شده در دنیا داروهایی با منشاء گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان عصاره گیری شده‌اند و یا بر اساس ترکیب گیاهی سنتز شده‌اند (۹،۲۳). گیاهان به طور واضح به عنوان منبع بالقوه ضد تک یاخته‌ای 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 (۹،۲۴).

از جمله این گیاهان دارویی *Z. Christi* (گیاه کنار) است که به نام‌های عناب و خارمسیح شناخته شده است و یک درخت برگریز بومی مناطق گرم و معتدل و نیمه استوایی است که گروه‌های شیمیایی متعددی از جمله آلکالوئید، فلاونوئیدهای مختلف، تری ترپن ها و ساپونین گلیکوزیدها مثل کریستینین A و B و C و D که مهم‌ترین آنها کریستینین A می‌باشد، در آن

وجود داردکه تاثیرات سودمند برگ، میوه، ریشه و پوست ساقه کنار را به این ترکیبات شیمیایی نسبت می‌دهند (۱۸). تاکنون مطالعه‌ای دقیق، جهت تأیید اثر ضد لیشمانیایی گیاه کنار انجام نشده است. در این مطالعه اثربخشی عصاره گیاه *Z. Christi* بر روی سویه استاندارد پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* به روش رنگ سنجی MTT بررسی شد.

پس از انجام آزمایش‌ها و بررسی نتایج مشخص شد که یک رابطه مستقیم بین غلظت عصاره‌های گیاه کنار و همچنین زمان تیمار شدن انگل‌ها با میزان اثربخشی عصاره وجود دارد.IC50 به دست آمده از عصاره‌های متانولی و آبی گیاه کنار در زمان ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۲۲ و ۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بود و IC50 داروی کنترل گلوکانتیم بعد از ۷۲ ساعت برابر با ۱۴/۲۷ میکرو گرم بر میلی لیتر بود.

Z.spinaChristi در میان گیاهان کلیدی در طب سنتی ایران از زمان‌های قدیم بوده استو در سراسر ایران بومی است و به عنوان سدر در ایران شناخته شده است و در مناطق شرق، جنوب، شمال شرق و مناطق مرکزی توزیع وسیعی دارد (۲۵). عصاره گیاه کنار دارای خاصیت ضد قارچی بسیار قوی علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد (۲۶).

همچنین دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورنوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، گونه‌های *کلبسیلا*، *اشریشیاکلی*، *پروتئوس ولگاریس* و ... می‌باشد (۱۵،۲۷).

تحقیقات دیگر، حاکی از اثر آنتی اکسیدانی عصاره برگ‌های کنار در برابر قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* می‌باشد (۱۸).

از مقایسه IC50 دو عصاره متانولی و آبی گیاه کنار به این نتیجه رسیدیم که عصاره متانولی گیاه کنار با داشتن IC50 کمتر، اثربخشی به مراتب بیشتری در مقایسه با عصاره آبی گیاه کنار روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* دارد. این نتایج نشان می‌دهند که اگرچه اثربخشی این عصاره‌ها روی انگل *لیشمانیا ماژور* کمتر از اثربخشی داروی گلوکانتیم است، ولی همه عصاره‌ها بر پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* تأثیر قابل ملاحظه‌ای نشان دادند.

با توجه به اینکه عصاره‌های گیاه کنار اثر مطلوبی بر روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* به صورت برون تنی از خود نشان داده‌اند، با این حال ضرورت انجام آزمایشات بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب پیشنهاد می‌شود. که این مطلب یکی از محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد. چون فرم اصلی بیماری زایی انگل، فرم اماستیگوت می‌باشد به همین علت نیاز به مطالعات بیشتر احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی:

دین وسیله از دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه آزاد فلاورجان به دلیل همکاری‌های ایشان، تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم صدیقه آل بخیت با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۲۲۰۰۸، تصویب شده در تاریخ ۹۲/۱۲/۲۱، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می‌باشد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.
2. WHO. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Commitee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. 2010.
3. Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. Indian J Med Res. 2005;121(4):407-14.
4. Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-induced apoptotic cell death on Leishmania major and L. tropica strains. Korean J Parasitol. 2011;49(1):17-23.
5. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006;123(3):399-410.
6. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharm Des. 2002;8(4):319-42.
7. Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia. 2009;80(2):81-90.

8. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):111-26.
9. Foroutan-Rad M, Hazrati Tappeh K, Khademvatan S. Antileishmanial and Immunomodulatory Activity of Allium sativum (Garlic): A Review. J Evid Based Complementary Altern Med. 2015: 1-15. doi: 10.1177/2156587215623126.
10. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine. 2005;12(6-7):514-35.
11. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. Phytochemistry. 2005;66(17):2056-71.
12. Saki J, Khademvatan S, Pazyar N, Eskandari A, Tamoradi A, Nazari P. In vitro activity of Cordia myxa Mucilage extract against Leishmania major and L. infantum promastigotes. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(3):e19640.
13. Feily A, Saki J, Maraghi S, Moosavi Z, Khademvatan S, Siahpoosh A. In vitro activity of green tea extract against Leishmania major promastigotes. Int J Clin Pharmacol Ther. 2012;50(3):233-6.
14. Abalaka M, Mann A, Adeyemo S. Studies on in-vitro antioxidant and free radical scavenging potential and phytochemical screening of leaves of Ziziphus mauritiana L. and Ziziphus spinachristi L. compared with Ascorbic acid. J Med Genet Genomics. 2011;3(2):28-34.
15. El-Kamali HH, Mahjoub SA-T. Antibacterial activity of Francoeuria crispa, Pulicaria undulata, Ziziphus spina-christi and Cucurbita pepo against seven standard pathogenic bacteria. Ethnobot Leaflets. 2009;2009(6):6.
16. Adzu B, Haruna AK. Studies on the use of Zizyphus spina-christi against pain in rats and mice. Afr J Biotechnol. 2007;6(11).
17. Adamu HM, Abayeh O, Ibok N, Kafu SE. Antifungal activity of extracts of some Cassia, Detarium and Ziziphus species against dermatophytes. Nat Prod Radiance. 2006;5(5):357-60.
18. Abdel-Wahhab MA, Omara EA, Abdel-Galil MM, Hassan NS, Nada SA, Saeed A, et al. Zizyphus spina-christi extract protects against aflatoxin B1-initiated hepatic carcinogenicity. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007;4(3):248-56.
19. Khademvatan S, Saki J, Gharavi MJ, Rahim F. Allium sativum extract induces apoptosis in Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) promastigotes. J Med Plant Res. 2011;5(16):3725-32.
20. Khademvatan S, Adibpour N, Eskandari A, Rezaee S, Hashemitabar M, Rahim F. In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against Leishmania major and Leishmania infantum promastigotes. Exp Parasitol. 2013;135(2):208-16.
21. Yousefi E, Eskandari A, Gharavi MJ, Khademvatan S. In vitro activity and cytotoxicity of Crocus sativus extract against leihmania major (MRHO/IR/75/ER). Infect Disord Drug Targets. 2014;14(1):56-60.
22. Allahdin S, Khademvatan S, Hashemitabar M, Eskandari A. In vitro activity of Camellia sinensis extracts against L. major and L. infantum promastigotes using the Colorometric MTT Assay. Urmia Med J. 2014;25(10):893-900.