تاثیر مهارکنندگی عصارهٔ آبی الکلی موسیر (*Allium hirtifolium* Boiss.) بر روی رشد لیشمانیا اینفانتوم در شرایط آزمایشگاهی

یعقوب امن‌زاده[۱]، محمد ایزددوست[۱]، علی سلطان‌پور[۲]، محمود محامی[۳]، مروت طاهری[٤]، محمد خلیفه‌قلی[٥]، نجم‌الدین کلانتری[٦]، مجتبی تاران[۷]، سیداسماعیل سادات ابراهیمی[۸*]

۱- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشجوی دکترای فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دانشجوی کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی، دانشکدهٔ بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

٤- دانشجوی دکترای میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

٥- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

٦- رزیدنت اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۷- دانشجوی دکترای انگل‌شناسی پزشکی، دانشکدهٔ بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۸- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* آدرس مکاتبه: تهران، گروه شیمی‌دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۹-٦٦٩٥٩٠٩٠ (۰۲۱)، نمابر: ٦٦٤٦١١٧٨ (۰۲۱)

پست الکترونیک: sesebrahimi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۵ **تاریخ تصویب:** ۸۵/۹/۱

چکیده

مقدمه: اثرات ضد تک‌یاخته‌ای گیاهان جنس آلیوم مثل سیر و پیاز از قرن‌ها پیش ثابت شده است.

هدف: بررسی اثر مهارکنندگی عصارهٔ آبی الکلی موسیر بر رشد لیشمانیا اینفانتوم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

روش بررسی: تاثیر غلظت‌های مختلف این عصاره (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در محیط کشت اشنایدر بر روی انگل در فاصلهٔ ۷ روز بررسی شد.

یافته‌ها: غلظت ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره، رشد انگل را در روز سوم و بالاترین غلظت (۰/۲) رشد انگل را در روز اول متوقف کردند.

نتیجه‌گیری: در این بررسی، اثر مهاری عصارهٔ آبی الکلی (محتوی آلیسین، آجوئن و دیگر ترکیبات) بر روی رشد لیشمانیا اینفانتوم ثابت شد. برای ارزیابی دقیق‌تر خواص ضد لیشمانیایی موسیر نیاز به ارزیابی اثرات مهاری این گیاه در شرایط **in vivo** است.

گل‌واژگان: لیشمانیا اینفانتوم، موسیر، ***Allium hirtifolium***

مقدمه

موسیر از گیاهان بومی کشور ایران است که استفاده از آن و دیگر گیاهان جنس آلیوم شامل سیر و پیاز به عنوان دارو و چاشنی غذا به سال‌ها پیش برمی‌گردد [۱،۲].

اخیراً اثرات ضدکرمی، ضد تک‌یاخته‌ای، ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدویروسی گیاهان جنس آلیوم به خوبی اثبات شده است [۳،٤،٥،٦،٧،٨،٩].

از این گیاهان همچنین جهت درمان دیابت، آرتریت، سرماخوردگی، استرس، تب، سرفه، سردرد، هموراژی، آسم، آترواسکلروزیس و سرطان استفاده می‌شود [۱۰،۱۱].

بررسی‌های زیادی نشان داده‌اند که گیاهان جنس آلیوم بر ضدبعضی تک‌یاخته‌ها مثل آنتامباهیستولیتیکا، ژیاردیا لامبلیا، تریکوموناس واژینالیس، مالاریا، اوپالینارانارروم و تریپانوزوم‌ها موثر هستند [۱،۲،۸،۹]. لیشمانیا اینفانتوم یک تاژکدار انگلی داخل سلولی است که ماکروفاژها را درگیر می‌کند و باعث ایجاد لیشمانیوز احشایی تیپ مدیترانه‌ای در ایران می‌شود. این انگل توسط پشه خاکی به انسان منتقل می‌شود [۱۲،۱۳،۱٤،۱٥]. لیشمانیوز احشایی تیپ مدیترانه‌ای معمولاً بچه‌های زیر ٥ سال را درگیر می‌کند. این بیماری معمولاً همراه با تب، ضعف، بزرگی طحال، بزرگی کبد، سیتوپنی، کاهش وزن و هیپرگاماگلوبولینمی است [۱٦،۱۷].

علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در بیولوژی مولکولی لیشمانیا هیچ داروی موثر جدیدی برای درمان این بیماری پس از معرفی ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان ارایه نشده است [۱۸]. ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان برای درمان اکثر فرم‌های لیشمانیوز ترجیح داده می‌شود و آمفوتریسین B و پنتامیدین در درجهٔ دوم اهمیت قرار دارند [۱۸،۱۹،۲۰].

مواد و روش‌ها

۱) تهیهٔ عصاره آبی الکلی موسیر

نمونهٔ موسیر استفاده شده در این بررسی از خوانسار همدان تهیه گردید. ابتدا غدد موسیر با آب شسته و به قطعات کوچک خرد شد. سپس قطعات کوچک موسیر به مدت یک ماه در اتانول ٥٠ درصد و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد خیسانده شدند. در مرحلهٔ بعد، عصارهٔ به دست آمده از کاغذ صافی رد شد و در دمای اطاق کاملاً خشک شد. عصاره خشک شده، برای استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲) کشت انگل

برای ارزیابی اثر مهاری عصارهٔ آبی الکلی موسیر، لیشمانیا اینفانتوم سویهٔ ایرانی در محیط کشت اشنایدر حاوی ۱٥ درصد FCS و ٥٠٠ IU آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین کشت داده شد.

۳) تماس انگل با عصاره و ارزیابی اثر مهاری موسیر

ابتدا غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ آبی الکلی موسیر به عنوان محلول مخزن تهیه شد و سپس با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید. غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰٥، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره در محیط کشت تهیه شدند. در نهایت پس از اضافه کردن عصاره و انگل به محیط کشت، هر لوله محتوی ٥ میلی‌لیتر محیط کشت اشنایدر به همراه ۱٥ درصد FCS و ٥٠٠ IU آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، 10^5 انگل فعال و غلظت‌های مذکور از عصاره بود. لازم به ذکر است که برای هر غلظت از عصاره، ٥ لوله‌ی محیط کشت در نظر گرفته شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۲٥ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و تعداد انگل‌ها هر روز به مدت ۷ روز بررسی و شمارش می‌شدند و میانگین چهار بار شمارش انگل‌ها در هر غلظت برای هر روز محاسبه و ثبت شد. این آزمایش‌ها ٤ بار تکرار شد و هر بار ٤ محیط کشت بدون عصاره نیز به عنوان شاهد درنظر گرفته شد.

٤) آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) آنالیز شدند و P value کمتر از ۰/۰۱ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

با توجه به اینکه چهار محیط کشت شاهد برای رشد استاندارد انگل لیشمانیا اینفانتوم در نظر گرفته شده بود میانگین چهار بار شمارش برای رسم منحنی رشد استاندارد انگل

استفاده شد (شکل شماره ۱). میانگین تعداد انگل در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره در محیط کشت اشنایدر با میانگین تعداد انگل در محیط‌های کشت شاهد مقایسه شد. این نتایج نشان می‌دهند که رشد انگل در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره در روز سوم مهار شد ولی رشد انگل در بالاترین غلظت (۰/۲) در روز اول مهار گردید (شکل شماره ۱).

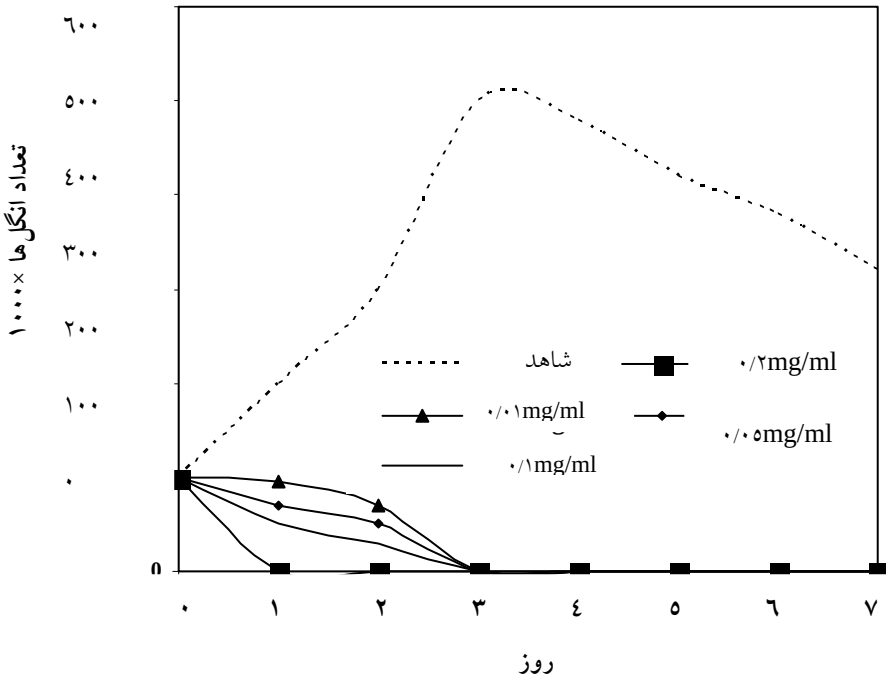
بحث

الگوی منحنی رشد استاندارد انگل به تعداد اولیه انگل فعال، دمای محیط و شرایط محیط کشت بستگی دارد. در این بررسی، اثرعصارهٔ آبی الکلی موسیر بر روی رشد لیشمانیا اینفانتوم ارزیابی شد. منحنی رشد استاندارد انگل نشان می‌دهد که تعداد انگل از روز سوم تا روز هفتم کاهش پیدا می‌کند. با توجه به مشابه بودن شرایط محیطی در همهٔ آزمایش‌ها، نتایج تاثیر عصارهٔ آبی الکلی موسیر اختلاف معنی‌داری با رشد انگل در محیط‌های کشت شاهد نشان می‌دهد ($p<$ ۰/۰۱). این نتایج نشان می‌دهد که مقاومت ذاتی لیشمانیا اینفانتوم به ترکیبات موثر موسیر در غلظت‌های پایین (۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به وقوع نمی‌پیوندد. عصارهٔ آبی الکلی موسیر محتوی ترکیبات سولفیدی از قبیل آلیسین، آجوئن و دیگر ارگانوسولفورها است و می‌توان گفت که خواص ضدلیشمانیایی این عصاره مربوط به این ترکیبات است.

همچنان‌که بررسی‌های گذشته نشان داده‌اند، این ترکیبات اثر مهاری روی آنتامباهیستولیتیکا، تریکوموناس واژینالیس و ژیاردلیا لامبلیا دارند [۲٤، ۲۳، ۲۱، ۹، ۸].

عصارهٔ آبی الکلی موسیر در مقایسه با گیاهان دیگر جنس آلیوم، رشد لیشمانیا اینفانتوم را در غلظت‌های پایین‌تر و زمان‌های کمتر مهار می‌کند. در نتیجه این گیاه ترکیبات ضدلیشمانیایی بیشتری نسبت به گیاهان دیگر جنس آلیوم دارد [۱٤].

بررسی‌های کمی در مورد اثرات ضد لیشمانیایی گیاهان جنس آلیوم صورت گرفته است. بنابراین بررسی بیشتری برای شناخت اثرات دقیق‌تر ضد لیشمانیایی این گیاهان لازم است و بررسی‌های آزمایشگاهی همراه با بررسی‌های in vivo برای ارزیابی



دقیق‌تر این خواص نیاز است. در این مطالعه اثر عصارهٔ آبی الکلی موسیر بر روی فرم خارج سلولی لیشمانیا اینفانتوم (پروماستیگوت) صورت گرفت، در حالیکه اشکال داخل سلولی این انگل (آماستیگوت) در ایجاد بیماری نقش بیشتری دارند و فرم آماستیگوتی انگل از لحاظ متابولیسم نیز با فرم پروماستیگوتی فرق دارد. بنابراین بررسی‌های آزمایشگاهی همراه با مطالعات in vivo برای ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی این عصاره باارزش‌تر خواهند بود [۲۷، ۲۶، ۲۵، ۲٤].

منابع

1.Harris JC, Cottrell SL, Plunmer S, Lloyd, D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2001; 57: 282-286.

2.Hann G. History, folk medicine and legendary uses of garlic. Williams and Wilkins. Baltimore. 1996, pp: 37-107.

3.Fromtling RA, Bulmer GS. In vitro effect of aqueous garlicextract (*Allium sativum*) on the growth and viability of Cryptococcus neoformans. *Mycologia* 1978; 70: 397 – 405.

4.Ghannoum MA. Studies on the anticandicidal mode of actionof *Allium sativum* (garlic). *J. Gen. Microbiol*. 1988; 134: 2917–2924.

5.Arora SD, Kaur J. Antimicrobial activity of spices. *J. Antimicrob*. 1999; 12: 257 – 262.

6.Bolton S, Null G, Troetel WM. The medicinal uses of garlic –fact and fiction. *Am. Pharm*. 1982; NS22: 40 – 43.

7.Hughes BG, Murray BK, North JA, Lawson LD. Antiviral constituents from *Allium sativum*. *Planta. Med*. 1989; 55: 114-119.

8.Mirelman D, Monheit D, Varon S. Inhibition of growth ofEntamoeba histolyica by allicin, the active principle of garlic extract (*Allium sativum*). *J. Infect. Dis*. 1987; 156: 243–244.

9.Lang YJ, Zhang KY. Studies on the effective componentsof garlic (*Allium sativum* L.). *Chin. Herb. Med*. 1981; 4: 4–6.

10. Jellin JM, Batz F, Hitchens K. Natural Medicines Comprehensive Data Base. 3th ed. Stockton. California. 2000, pp: 50 - 60.

11. Lueng AY. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs and Cosmetics. John Wiley. New York.1980, pp: 246.

12. Bogdan C. Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. C*urr. Opin. Immunol*. 1996; 8: 517 - 525.

13. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect .Dis*. 1996; 22:1-13.

14. Saleheen M, Atif Ali S, Massoom Yasinzai M. Antileishmania activity of aqueous of onion extract in vitro. *Fitotera*. 2004; 78: 9-13.

15. Mohebali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of Leishmania infantum in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Veteri. Parasitol*. 2004; 121: 239 - 245.

16. Harold WB. Basic Clinical Parasitology. 5th ed. Prentice Hall International. London. 1993, pp: 55.

17. Edward K. Markell and Voges' *Medical Parasitology*. 8th ed. Saunders. New York. 1999, pp: 123.

18. Lwu MM, Jackson Schuster BG. Medicinal plants in the fight againt leishmaniasis. *Parasitol. Tod.* 1994; 10: 65-68.

19. Bryceson A. Leishmaniases in Biology and Medicine. Academic Press. Vol 2. 1987, pp: 847.

20. Olliaro PL, Bryceson ADM. Antimalarial resistance and health policies. *Parasitol. Tod*. 1993; 9: 323 - 328.

21. Reuter HD, Koch HP, Lawson LD. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. Williams and Wilkins. Baltimore. 1996, pp: 135.

22. Soffar SA, Mokhtar GM. Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract in hymenolepiasis nana and giardiasis. *J. Egypt Soc. Parasitol*. 1991; 21: 497-502.

23. Lun ZR, Burri C, Menzinger M, Kaminsky R. Antiparasitic activity of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animalpathogenic protozoa (Trypanosoma sp, Entamoeba histolyica and Giardia lamblia) in vitro. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop*. 1994; 74: 51 – 59.

24. Weber ND, Anderson DO. In vitro virucidal effects of *allium sarivum* (garlic) extract and compounds. *Planta. Med*. 1992; 58: 417 - 423.

25. Perez HA, De La Rosa M, Apitz R. In vivo activity of ajoene against rodent malaria. *Antimicrob. Agenta. Chemother*. 1994; 38: 337-339.

26. Ghazanfari T. Garlic induce a shift in cytokine pattern in Lieshmania major infected balb/c mice. *Scand. J. Immunol.* 2000; 52: 491 - 495.

27. Urbina JA, Marchan E, Lazardi K, Visbal G, Apitz-Castro R, GilF, Aguirre T, Piras MM, Piras R. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in Trypanosoma cruzi by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochem. Pharmacol*. 1993; 45: 2381 - 2387.