پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، ویژه نامه ۱، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۱۲ تا ۱۸

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبــی گیاه Scophularia Straiata بر رشد لیشمانیا ماژور در ماکروفاژهای صفاق موش (BALB/c) ودر شرایط Invitro

راضی ناصری فر[۱*]، دکترعبد الحسین دلیمی اصل[۲]، نایبعلی احمدی[۳]

[۱] گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
[۲] گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *استفاده از ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی به عنوان داروهای خط اول درمان لیشمانیازیس جلدی، همراه با محدودیت‌ها و عوارض جانبی متعددی می‌باشد. داروهای با منشاء گیاهی می‌تواند به مرور جایگزین مناسبی باشد. به همین منظور در پژوهش حاضر، تاثیر داروی گیاهی Scrophularia striata که ازگیاهان بومی کشور می‌باشد، بررشد لیشمانیا ماژور در شرایط In vitro در سال ۱۳۹۰ مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *دریک بررسی تجربی، غلظت‌های ۱ ، ۵،۱۰ ، ۲۰ و۲۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره آبی گیاه تشنه داری درشرایط In vitro روی رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور درداخل پلیت ورشد آماستیگوت ها در ماکروفازها در غلظت های۱۰ ، ۲۰ و۲۵ میلی گرم در میلی لیتر درون محیط کشت RPMI مورد بررسی قرار گرفت. اثر بخشی گیاهان دارویی ازروی تعداد انگل تعیین گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های T test ، ANOVA و آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.*

یافته‌ها: *درغلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر دارو در روز سوم ودرغلظت ۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر تشنه‌داری درروز سوم باعث ازبین بردن کامل آماستیگوت های لیشمانیا ماژوردرون ماکروفاژگردید.کاهش رشد انگل درمحیط کشت RPMI تحت تاثیر تشنه داری درهر ۳ غلظت بطورمعنی داری بود (p=۰/۰۰۱). درصد ماکروفاژهای آلوده با افزایش غلظت وزمان آزمایش بطورمعنی داری درمحیط های کشت تحت تاثیردارو کاهش داشت ، به طوری که درروزهای دوم وسوم ماکروفاژ آلوده ای مشاهده نشد (p=۰/۰۰۱). پروماستیگوت های لیشمانیا ماژوردرمحیط کشت RPMI درمورد تشنه داری درغلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر ودرروزسوم باعث مرگ انگل گردید (p=۰/۰۰۱).*

نتیجه‌گیری: *عصاره آبی دارو در از بین بردن لیشمانیا ماژور درماکروفاژ ومحیط کشت، فعالیت ضد لیشمانیائی مطلوبی دارد. باتوجه به ارزانی، قابلیت دسترسی درکشور و اثربخشی، ساخت صنعتی و استفاده درمانی برای زخم‌های انسانی و پژوهش‌های کارآزمایی بالینی در این زمینه توصیه می‌شود.*

واژگان کلیدی: *عصاره آبی، Scrophularia striata، لیشمانیا ماژور، In vitro.*

مقدمه

اســتفاده از گیاهــان دارویــی بــرای درمــان بیمــاری‌هــا ســابقه طولانــی دارد، امروزه با اینکــه قســمت عمــده داروهــای منشــا شیمیایی دارند، اما برآورد شده است که حدود یک سوم کلیــه فرآورده های دارویی منشا گیاهــی داشته یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته‌اند (۳). در همین راستا با توجه به تنــوع آب و هوایی و در نتیجه فلور گیاهــی بســیار متنــوع در ایــران امکان شناسایی مواد موثــر گیاهــی در گیاهان مختلف بومـــی

آدرس نویسنده مسئول: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی، راضی ناصری فر (**e-mail:** razinaserifar@yahoo.com)

کشور و استخراج آنها به منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد، این کار به ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اهمیت ویژه‌ای دارد (۲). بیماری‌های انگلی در زمره شناخته شده‌ترین بیماری‌هایی هستند که همواره گریبان‌گیر انسان بوده و تلاش‌های زیادی جهت شناخت عوامل ایجاد کننده، درمان و کنترل آنها صورت گرفته است. یکی از بیماری‌های مهم انگلی لیشمانیوز است که امروزه گستره بیماری در حال پیشرفت باشد. از طرفی، مقابله با پدیده مقاومت دارویی اهمیت اساسی داشته و شاید داروهای گیاهی بتوانند در کاهش مقاومت به داروهای شیمیایی نقش قابل توجهی ایفا نماید، این امر مورد توجه سازمان جهانی بهداشت نیز قرار دارد (۲). گیاه گل میمونی (Scophularia Striata) با نام محلی تشنه داری از تیره Scophulariaceae بوده که اکثرا علفی یا بوته‌ای و به ندرت درختی، گل‌های پنج پر زیگومورف جام گل معمولا به صورت کسپول دارای دانه‌های متعدد می‌باشد، از سرشاخه‌های این گیاه به عنوان مقوی معده استفاده می‌شود (۴). با توجه به اشارات متعدد مبنی بر اثرات ضد میکربی و انگلی گیاهان دارویی بومی ایران و نیز افزایش مقاومت دارویی در اثر مصرف داروها جهت پیشگیری و درمان عفونت‌ها و نیز عوارض جانبی و اثرات سوء متعدد آنها، بررسی و تحقیق بر روی گیاهان دارویی به منظور کشف منابع جدید دارویی بر علیه عفونت‌های مختلف از اهمیت خاصی برخوردار است (۵، ۶). در سال‌های اخیر جایگزین نمودن مواد طبیعی جهت کنترل و درمان عفونت‌های به جای داروهای شیمیایی و صنعتی با اثرات جانبی نامطلوب گسترش زیادی پیدا کرده است (۹-۲). اسکروفولاریا استریاتا با نام محلی تشنه داری گیاهی خودرو و چند ساله است که در استان ایلام و مناطقی از استان خوزستان رشد می‌کند (۱۰). ترکیبات شیمایی این گیاه به خوبی شناسایی نشده است، اما مردم بومی سال‌هاست که به صورت تجربی از این گیاه به صورت مختلف از قبیل جوشانده، بخور، و ضماد در درمان بیماری‌های مختلف از جمله التهاب و عفونت‌های چشم و گوش، سوختگی، زخم‌های عفونی، سرما خوردگی و ... استفاده می کنند (۱۰). خواص درمانی بسیاری از عصاره گیاهی به علت وجود موادی نظیر تانن‌ها، ترکیبات فنولی و نظیر آن می‌باشد (۱۱). تیره گل میمون ترکیباتی نظیر الکالوئید، رزین گلیگوزید، اریدوئید و کریپتوفیلیک اسید شناسایی شده است (۱۳،۱۲) که معمولا این مواد در قسمت‌های مختلف گیاه نظیر ریشه، برگ، جوانه، نهال و پوست یافته می‌شوند (۲). در این تحقیق سعی شد که اثرات ضد انگلی عصاره آبی این گیاه بر لیشمانیا ماژور در شرایط Invitro و نیز در داخل ماکروفاژهای صفاقی موش به منظور بررسی (IC50) دارویی گیاهی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

این مطالعه به صورت تجربی در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۸۹-۱۳۸۸ انجام گردید. به منظور انجام این کار تحقیقی مواد مختلفی تهیه و با استفاده از روش‌های استاندارد نسبت به پیگیری مراحل مختلف اقدام گردید.

۱- تهیه کشت انگل لیشمانیا ماژور:

کشت انگل لیشمانیا در محیط‌های مصنوعی از اهمیت خاصی برخوردار است. پس از جداسازی گونه بومی لیشمانیا ماژور توسط مختصصین آزمایشگاهی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه تهران نسبت به کشت آن اقدام گردید. روش کشت مناسب در این تحقیق استفاده از (RPMI-1640) بود. این نوع محیط برای تهیه میزان قابل توجه انگل و کشت انبوه آن بر محیط های دو فازی برتری دارد (۱). استفاده از محیط‌های مایع به همراه ۱۰ تا ۳۰ درصد سرم گوساله (FCS) باعث ایجاد شرایط بسیار مطلوب برای تکثیر زیاد پروماستیگوت‌های لیشمانیا می‌گردد (۱). این محیط در سال ۱۹۳۶ توسط مورا و همکارانش معرفی گردید و به عنوان محیط مناسب کشت سلولی است که در کشت برخی تک یاخته های انگلی از جمله لیشمانیا نیز کاربرد وسیعی دارد. از نظر تجاری (RPMI-1640) به دو صورت پودر مایع در دسترس است و برای تهیه آن نیاز به اضافه کردن FCS (سرم جنین گاوی) دارد تا محیط غنی گردد. به منظور جلوگیری از خطر آلودگی محیط آنرا وارد فلا کس‌های کشت نموده و در آن بسته نگه می‌دارند که معمولا محیط RPMI رنگ قرمز تازه دارد و با رشد انگل به زردی می گراید ولی شفافیت محیط از بین نمی‌رود، در آزمایش میکروسکوپی انگل ملاحظه روزت‌ها تاییدی بر رشد مناسب انگل است.

۲- عصاره آبی گیاهی Scophularia Striata:

این گیاه از دامنه کوه‌های زاگرس جمع آوری شد. پس از تمیز کردن اندام هوایی همراه با ریشه آنرا در سایه خشک نموده و توسط آسیاب پودر ساخته و در شرایط مناسب و بهینه نگهداری گردید. برای تهیه عصاره آبی به ازای هر گرم پودر،

حدود ۱۰ میلی لیتـر آب مقطـر درون بشـر ریختـه و پـس از جوش آمدن آب مقطـر به آن پودر گیاه را اضـافه نمـوده و بـه مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. سپس مایع حاصلـه توسط قیف بوخنار و با استفاده از کاغـذ صـاف معمولـی صـاف شـد و در ادامه عصاره صاف شده به دستگاه حـذف حـلال منتقـل و تـا حدود ۸۰ درصد آب عصاره حـذف گردیـد. آنگـاه بقیـه آن در حمام آب گرم در دمای ۳۰ درجـه سانتـی گـراد تحـت عمـل حذف قرار گرفت. عصاره آبـی (بـا بـازده ۱۵ درصـد) پـس از فیلتـراسیون در غلظت‌های مختلف تهیه و استفاده شد (۲).

۳- تهیه سریال رقت دارو جهت بررسی Invitro:

پس از تهیه کشت لیشمانیا و انجام شمارش انگلـی با اسـتفاده از لام نئوبار، باید تعداد انگل در یک میلی لیتـر ۲۰×۱۰^{۶} انگل باشد. بر همین اساس، چنانچه با انجام پاساژ متعدد تعداد انگل از تعداد فوق الذکـر بیشتـر مـی‌شـد بـا اسـتفاده از محـیط (RPMI) رقیق می‌شد تا تعداد مطلـوب انگـل بـه دسـت آیـد. سپس از پلیت مخصوص کشت استفاده نموده و با اضافه کردن RPMI حاوی FSC به۵۰۰ میکرولیتر انگل موجود در محـیط کشت، نسبت به تهیه غلظت های مختلـف داروی تشـنه داری اقدام شد تا رقت‌های ۱ ، ۵ ۱۰۲۰ ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آید. اینها در ۲۷ درجه سانتـی گراد نگهداری شدند و پس از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ سـاعت بـا اسـتفاده از لام نئوبار شمارش انگلـی شدند و با شاهد مقایسه شدند. سپس با استفاده از روش‌های آماری نتایج آنالیز گردید.

۴- استخراج ماکروفاژ صفاقـی و بررسی (IC50) دارو:

به منظـور بررسـی (IC50) دارو، ابتدا ماکروفاژ موش استخراج شد. برای این کار از موش (BALB/c) استفاده گردیـد. مـوش در ظرف شیشه‌ای حـاوی اتـر بیهـوش شـد و در الکـل ۷۰٪ غوطه ور شد. سپس خشک و در زیـر هـود فـیکس شـد و بـا تجویـز ۵ میلی لیتـر سـرم فیزیولوژیـک اسـتریل بـه داخـل پریتوان و زدن چند ضربه دوباره کشیده شد تـا ماکروفاژهـای سرم موش خارج شدند. در صورت نیاز، با پـاره کـردن پوسـت ناحیه پریتـوان بـه ماکروفاژهـای پریتـوان دسترسـی بهتـری یافتیم. یک قطره از محلول حاوی ماکروفاژ روی لام قـرار داده شد و با عدسی ۴۰ بررسـی شد تا تعداد ماکروفاژهـا مشـخص گردد. بـا توجـه بـه محاسـبه حـدود ۱۰۰۰۰۰۰ ماکروفـاژ در سانتـی متـر مربـع وجود داشت و باید بـه ازای هـر ماکروفـاژ حدود ۱۰ انگل محاسبه می‌شد تا داخل ماکروفـاژ قـرار گیـرد. برای این منظور بایـد حـدود ۱۰۰۰۰۰۰۰ انگـل در مجـاورت ماکروفاژ قرار می‌گرفت، چـون در نمونـه موجـود تعـداد انگـل ۹۰۰۰۰۰۰ بود، لذا نسبت ۵/۵ میلی لیتـر از کشـت انگـل بـا ۴.۵ میلی لیتـر ماکروفاژ موجود در سرم فیزیولوژیـک بـا هـم مخلوط شد تا نسبت ده به یک انگل به ماکروفاژ رعایت گـردد. این مخلوط در انکوباتور ۳۷ درجه و فشـار ۵٪ Co_2 بـه مـدت یک شبانه روز قرار داده شد تا فرصتـی بـرای ورود انگـل بـه ماکروفاژ فراهم گردد. ظرف حاوی RPMI قدیمی خالـی شـد و با آب مقطـر استریل شستشو شد و سپس بـا RPMI حـاوی FCS وارد فلاکـس شـد و روی ظـرف یـخ قـرار گرفـت تـا ماکروفاژهای حاوی انگل کنده شـود. حـدود ۱۰۰ میکرولیتـر ماکروفاژهای حاوی انگل محلول در RPMI به هر یک از ویل-های پلیت کشت سلولـی اضافه شدند و غلظـت‌هـای مختلـف داروی تشنه داری در رقت‌هـای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلـی گـرم در میلی لیتر وارد ویل‌ها شدند و با شاهـد مقایسه شـدند. سـپس در روز های اول دوم و سوم لام از غلظت‌هـای مختلـف دارو و فیکس نمودن آن بـا متـانول و سـپس رنـگ آمیـزی بـا روش گیمسا نسبت به شمارش تعداد انگل در ۱۰۰ ماکروفـاژ اقـدام شد تا IC50 دارو به دست آید.

داده‌ها با آزمون آماری t-test و ANOVA مورد قضاوت آماری قرار گرفتند و در صورت معنی‌دار بـودن از پـس‌آزمـون تـوکی برای مقایسات چندگانه استفاده شد.

یافته‌ها

دراین مطالعه غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میلـی گـرم در میلـی لیتـر عصـاره آبـی داروی گیـاهی تشـنه داری روی تعـداد آماستیگوت هـای لیشـمانیا مـاژوردرون ماکروفاژهـای صـفاق موش در محیط RPMI و غلظت هـای ۱،۵،۱۰،۲۰ و۲۵ میلـی گرم در میلـی لیتـر عصـاره آبـی داروهـای مـذکور بـر رشـد پروماستیگوت های کشت داده شده در محیط RPMI در سـه روز متوالی مورد مقایسه قرار گرفتند. غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر و در روز سوم دارو در جدول ۱ ارائـه شـده و نشـان می‌دهد که باعـث حـذف کامـل آماسـتیگوت هـای لیشـمانیا ماژوردرماکروفاژهای درون محیط کشت RPMI شده اند .تعداد انگل درمحیط تحت تاثیرتشنه داری۱/۵۳± ۴۹/۷ بـود. درروز دوم نیزکاهش تعداد انگل درمحیط تشنه داری وجـود داشـته است. این کاهش به لحاظ آماری معنی‌دارمی‌باشد (p=۰/۰۰۱). درغلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر تشنه داری در روز سـوم و درمنه درروز دوم در جدول ۲ ارائه شده و نشان می‌دهد کـه باعث از بین رفتن کامل آماستیگوت‌ها شـد. همچنـین تعـداد انگل درروز اول درمحیط تحت تـاثیر تشـنه داری بـه ۱± ۴۲

جدول ۱- تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر داروی تشنه‌داری روی ماکروفاژهای صفاق موش در محیط کشت (RPMI)*

	قبل از مواجهه($۱۰^۴$) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۱۰۳±۱/۵	۴۹/۷ ±۱/۵۳	۶ ± ۱	۰	
محیط کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۱۰۳±۱/۵	۷۳ ± ۱۰/۵	۶۴±۹/۲	۳۲ ± ۱/۳	

* محیط کشت RPMI به همراه ۱۰٪FCS

جدول ۲- تعداد آماستیگوت های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری روی ماکروفاژهای صفاق موش در محیط کشت (RPMI)

	قبل از مواجهه($۱۰^۴$) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۱۰۳±۱/۵	۴۲ ±۱	۳/۷ ± ۰/۵۸	۰	
محیط کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۱۰۳±۱/۵	۷۳ ± ۱۰/۵	۶۴±۹/۲	۳۲ ± ۱/۳	

جدول ۳- تعداد آماستیگوت های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری روی ماکروفاژهای صفاق موش در محیط کشت (RPMI)

	قبل از مواجهه($۱۰^۴$) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۱۰۳±۱/۵	۳۶ ±۵/۲	۲/۷ ± ۱/۵	۰	
محیط کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۱۰۳±۱/۵	۷۳ ± ۱۰/۵	۶۴±۹/۲	۳۲ ± ۱/۳	

کاهش پیدا نمود. اختلاف مشاهده شده به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (p=۰/۰۰۱).

درغلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر تعداد آماستیگوت ها درمحیط تحت تاثیرتشنه داری۵/۲± ۳۶/۷ بود. بدین ترتیب غلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر درمقایسه با سایر غلظت ها درکاهش تعداد و یا نابودی انگل موثرتر می‌باشد (p=۰/۰۰۱) (جدول ۳).

مقایسه درصد ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت در محیط‌های کشت تحت تاثیر غلظت های سه گانه تشنه داری وبه تفکیک روزهای آزمایش نشان داد ، غلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر درکاهش ویا محو کامل آماستیگوت های آلوده به طورمعنی داری نسبت به سایر غلظت ها ازتاثیر بیشتری برخوردار می‌باشد (p=۰/۰۰۱) (جدول ۴).

ازدیگریافته‌ها، مقایسه غلظت‌های ۱ ، ۵ ، ۱۰ ، ۲۰ و۲۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره آبی داروی تشنه داری برمیزان رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژوردر داخل پلیت کشت می‌باشد. درروز اول تشنه داری به طورمعنی‌داری سبب کاهش رشد انگل شد (p=۰/۰۰۱) (جدول ۵). به ترتیب باافزایش زمان آزمایش تشنه داری درکاهش رشد انگل تاثیر قابل توجهی داشت.

درغلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر کاهش رشد پروماستگوتها درمحیط تحت تاثیر درمنه محسوس‌تر ازغلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر می باشد. درمورد تشنه‌داری نیز با افزایش زمان رشد انگل به طور معنی‌داری کاهش داشت (p=۰/۰۰۱) که نسبت به غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر بیشتراست (جدول ۶).

جدول ۴- درصد ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت لیشمانیا ماژور با استفاده ازغلظت هـای ۱۰، ۲۰و ۲۵ میلـی گـرم در میلـی لیتـر داروی تشنه داری روی ماکروفاژهای صفاق موش در محیط کشت RPMI

	در صد ماکروفاژهای آلوده			P.value
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر۱۰ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری	٪۵۱	٪۷	٪۳	
محیط کشت تحت تاثیر ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری	٪۴۳	٪۵	۰	
محیط کشت تحت تاثیر۲۵ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری	٪۴۰	٪۴	۰	
محیط کشت بدون دارو	٪۸۶	٪۷۷	٪۳۵	

جدول ۵- مقایسه رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظـت ۱ میلـی گـرم در میلـی لیتـر داروی تشـنه داری درمحیط کشت (RPMI)*

	قبل از مواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۶۴۰±۱۳/۸	۳۸ ± ۲	۳۴/۳ ± ۴	۲۸/۳ ± ۳/۵	
محیط کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۶۴۰±۱۳/۸	۵۳۰ ±۱۵	۵۵۰ ±۱۶/۵	۷۷۸ ±۱۹	

*محیط کشت RPMI به همراه ٪۱۰CSF

جدول ۶- رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظت ۵ میلی گرم در میلـی لیتـر داروی تشـنه داری درمحـیط کشت RPMI

	قبل از مواجهه($۱۰^۴$) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۶۴۰±۱۳/۸	۱۶ ± ۲	۱۵ ± ۱	۶/۷ ± ۱/۵	
محیط کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۶۴۰±۱۳/۸	۵۳۰ ±۱۵	۵۵۰ ±۱۶/۵	۷۷۸ ±۱۹	

جدول ۷- رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشـنه داری درمحـیط کشت RPMI

	قبل از مواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۶۴۰±۱۳/۸	۱۲ ± ۱	۸/۳ ± ۶/۴	۴ ± ۱	
محیط کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۶۴۰±۱۳/۸	۵۳۰ ±۱۵	۵۵۰ ±۱۶/۵	۷۷۸ ±۱۹	

درغلظـت ۱۰ میلـی گـرم در میلـی لیتـر داروی تشـنه داری درکاهش ویا حذف کامل انگل نسبت به غلظت ۵ میلـی گـرم در میلی لیتر موثرتر بودند (p=۰/۰۰۱) (جدول ۷).

یافته ها نشان داد در غلظت ۲۰ ٪ تشنه‌داری بـه طـور معنـی داری باعث کـاهش رشـد پروماسـتیگوت‌هـا شـد (p=۰/۰۰۱) (جدول ۸).

درغلظت ۲۵ میلی‌گرم در میلـی لیتـر تشـنه‌داری درروز سـوم باعث مرگ کلیه پروماستیگوت هـا شـد ودرروزهـای اول ودوم نیز به طور کاملا معنـی داری باعـث کـاهش رشـد انگـل شـد (p=۰/۰۰۱) (جدول ۹). بدین ترتیـب مـی تـوان گفـت تشـنه داری درغلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین اثـربخش را دارد.

درجدول ۱۰ تاثیر عصاره آبی غلظت های مختلف داروی تشته داری طی سه روز متوالی بررشد پروماستیگوت های لیشـمانیا ماژور در محیط کشت RPMI بطـورکلی بـا یکـدیگر مقایسـه شده است. تشنه داری نیزدرغلظـت ۲۵ میلـی گـرم در میلـی لیتر و در روز سوم باعـث حـذف کامـل انگـل شـد و در بقیـه

جدول ۸- مقایسه رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری درمحیط کشت RPMI

	قبل از مواجهه(۱۰۴) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه(۱۰۴) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۶۴۰±۱۳/۸	۹ ± ۱	۶/۳ ± ۱/۵	۱ ± ۱	
محیط کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۶۴۰±۱۳/۸	۵۳۰ ±۱۵	۵۵۰ ±۱۶/۵	۷۷۸ ±۱۹	

جدول ۹- رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور قبل و پس از استفاده ازغلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری درمحیط کشت RPMI

	قبل از مواجهه ($۱۰^۴$) (Mean±SE)	بعد ازمواجهه($۱۰^۴$) (Mean±SE)			P.value
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر داروی تشنه داری	۶۴۰±۱۳/۸	۱ ± ۱	۱ ± ۱	۰	
محیط های کشت بدون دارو (گروه کنترل)	۶۴۰±۱۳/۸	۵۳۰ ±۱۵	۵۵۰ ±۱۶/۵	۷۷۸ ±۱۹	

جدول ۱۰- رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور درغلظت ۱ ، ۵ ،۱۰، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر داروی تشنه داری و درمنه در محیط کشت (IRPM) در زمانهای مختلف

	میانگین تعداد پروماستیگوت(۱۰۴)			P.value
	۲۴ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ساعت	۰/۰۰۱
محیط کشت تحت تاثیر غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر	۳۸±۲	۳۴/۳±۴	۲۸/۳±۳/۵	
محیط کشت تحت تاثیر غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر	۱۶/۲±۲	۱۵±۱	۶/۷±۱/۵	
محیط کشت تحت تاثیر غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر	۱۲±۱	۸/۳±۶/۴	۴±۱	
محیط کشت تحت تاثیر غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر	۹±۱	۶/۳±۱/۵	۱±۱	
محیط کشت تحت تاثیر غلظت ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر	۱±۱	۱±۱	۰	
محیط کشت بدون دارو	۵۳۰±۱۵	۵۵۰±۱۶/۵	۷۷۸±۱۹	

غلظت‌ها با افزایش زمان آزمایش کاهش رشد انگل نیز بیشتر شد (p=۰/۰۰۱).

بحث

نتایج تحقیقات نشان داد که گیاه گل میمونی از ویژگی‌های ضد باکتریال در شرایط invitro برخوردار است. طبق بررسی‌های انجام شده توسط محققین مختلف و استخراج مواد مختلف از دیگر گونه‌های اسکوفولاریا احتمال می‌رود که با توجه به اشتراک بسیاری از ترکیبات در گونه‌های پراکنده در سراسر دنیا حداقل بعضی از آنها در تشنه داری وجود داشته باشد. لذا ممکن است موثر بودن گیاه تشنه داری در روند ترمیم به خاطر وجود ترکیبات گلیکوزیدی ایریلوئیدی در قسمت‌های مختلف در با مهار تولید پروستاگلاندین (E2) وانترلوکین‌های مختلف (IL1a, IL 2, IL 4) که با فاکتور (TNF) و (INF-γ) باعث کاهش ادم و ارتشاح سلولی و کاهش تکثیر لنفوسیت‌های T می‌شود (۲۰-۱۴). علاوه بر آن افزایش رشد فیبروپلاست‌ها زمینه را برای ترشح بیشتر کلاژن و در نتیجه ترمیم سریع‌تر زخم فراهم می‌نماید (۱۶). در ضمن وجود گلیکوترپنوئیدهای مختلف در دیگر گونه‌های اسکروفولاریا باعث کاهش ادم و توقف ارتشاح سلولی شده و خاصیت ضد التهابی نیز دارد (۱۷). وجود گلیکوزیدهای فنیل پروپانوئید که مهار کننده فعالیت ماکروفاژ ودر نتیجه مهار تولید واسطه‌های شیمیایی التهابی و در نهایت کاهش التهاب می‌شود (۱۸). وجود اسیدهای فنولیک با خاصیت ضدباکتریال در برخی گونه ها دلیل دیگری بر تاثیر گیاه در التیام زخمهای پوستی می‌باشد (۱۹). با این حال تحقیقات در مورد این گیاه هنوز در مراحل ابتدایی بوده و با توجه به مصرف

گسترده آن در منطقه توصیه می‌شـود کـه مطالعـات کاملتـــری روی اجـزای گیاه و اثـرات ضد انگلـی آن در طیف وسیع انجـام پذیرد. ضمن آنکه تحقیقات نشـان داد کـه اسـکروفولاریا باعـث مهـار تولید NO در ماکروفاژ های فعال شده موش (۲۱) که این مسئله نشانگـر کاربرد این گیاه به عنوان ضد التهاب می‌باشد.

REFERENCES

۱. حاتم غلامرضا و همکاران. روش جداسازی و شناسایی انگل لیشمانیا. شیراز: انتشارات علوم پزشکـی شیـراز؛ ۱۳۸۴.

۲. عباسـی ناصـر و همکاران. بررسـی اثـر ضد میکربـی گیاه اسکروفولاریا بر روی استافیلوکوک اوروئوس و پسودوموناس ائـروژینوزا و مقایسه آن بـا آنتـــی بـادی های انتخابـی. فصلنامه دارویی ۱۳۸۴؛ سال ششم – ویژه نامه شماره ۱

3. Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. JAMA 1998;280:1569-75.

4. Azadbakht M. Classification of medical plants. Tehran: Teimorzadeh Pub; 2000. p.7-276. [In Persian]

5. Shirazi MH, Fazeli MR, Sultan Dallal MM, Eshraghi S, Jamalifar H, Alamulhoda E. A comparative study on the antimicrobial effect of some medicinal herbal extracts and selective antibiotics against *Helicopter pylori*. J Med plant 2003; 2:53-70.

6. Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, Falsafi T. Anti-Helicobacter pylori activities of six Iranian plants. Helicobacter 2004; 9: 146-51.

7. Valnet J, Editor. Phytotherapy treatment of disease by plant. 7th ed. Tehran: Rahe Kamal Pub. 2002. p: 61-358.

8. Zargari A, Editor. Medical plants. 7th ed. Tehran: Tehran University Pub; 1997. p: 14-59. [In Persian]

9. Chlabian F, Norouzi H, Mossavi S. A study of growth inhibitory effect of essential oils of seven species from different families on some kind of microbes. J Med plant 2003; 2: 37-41. [In Persian]

10. Shohani F, Editor. People hournalism of Ivan. Ilam: Ilam Cultural heritage Org; 2003. p.56-57. [In Persian]

11. Avijgan M. Anti fungal effect of rchinophora platyloba extract on some common dermatophytes. J Med Plants 2006; 5: 10-16. [In Persian]

12. Tasdemir D, Brun R, Franzblau SG, Sezgin Y, Calis I. Evaluation of antiprotozoal and antimicrobial acitivity of the resinglycoside and other metabolites of scrophularia. Phytomedicine 2008; 15: 209-15.

13. Shams F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. Spectrophotometric determination of total alkaloid in some Iranian medicinal plants. Thai Pharm Sci 2008; 32: 17-20.

14. Bas E, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Escandell JM, López-Ginés C, et al. Inhibitlon of the inflammatory response to expermintal delyed type hydro sensitivity reaction in mice by scopholiside. Eur J Pharmacol 2007; 555:199-210.

۱۵. شرافتـی فرهاد و همکاران. اثـر ضد میکربـی عصاره آبی و اتانولـی گیاه اسکوفولاریا اسـتریاتا بـر Ecoli در شـرایط آزمایشگاهـــی. مجلـه علمـــی پزشکـــی شهـرکرد. زمستان ۱۳۸۷؛ ویژه نامه طب تکمیلی: ۳۲-۳۷.

16. Steven P, Simmonds MS, Sampson J, Houghton PJ, Grice P. Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from scrophularia nodosa. Phytother Res 2002; 16: 33-35.

17. Giner RM, Villalba ML, Recio MC, Máñez S, Cerdá-Nicolás M, Ríos J. Anti inflammatory glycoterpenoids from scrophularia aurculata. Eur J Pharmacol 2000; 389: 243- 52.

18. Diaz A. Phenyl propanoid glyrosides from scrophularia scorodania: in vitro anti-inflammatory activity. Life Sci 2004; 75: 2515-26.

19. Frenandez M. Anti bacterial activity of phenolic and fraction of *Scorphulularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. Ethnopharmacol J 1996; 53: 4-11.

20. Bas E. Inhibition of the proinflammtory mediatory production and anti inflammatory effect of iridoid scrovalentino side. Ethnopharmacology 2007;110:414-27.

21. Zadmehr A. Suppression of nitric oxide production activated murine peritoneal macrophages in vitro and ex vive by *scrophularia strita* a favolic extract. J Ethnopharmacol 2009; 124: 166-69.