Research on Medicine

Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Vol.42; No.1; 2018

Effect of olive leaf aqueous and hydroalcoholic extract on Leishmania tropica Glucantime resistance and sensitivity in vitro

Zahra Poursafavi[1*], Seyyed Javad Seyyed Tabaei[1], Farnaz Kheirandish[2], Mehdi Mohebali[3], Mohammad Kamalinezhad[1], Rezvan Vajdian[1]

1. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Lorestan, Iran

3. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2016/12/25 Accept: 2017/11/4)

Abstract

Background: *Cutaneous Leishmaniasis is the most important parasitic disease. As the number of resistant types to glucantime (drug of choice) is increasing, it is necessary to investigate the effects of other drugs, like herbal medicines, on this disease. Several studies have shown the anti Leishmania effects of olive leaf on the Leishmania and also some organisms. The aim of the present study was to evaluate the in vitro effects of olive leaf aqueos and hydroalcoholic extract on amastigots of Leishmania tropica glutamimn resistance and sensitivity in vitro.*

Materials and Methods: *Mouse peritoneal macrophages for the maintenance of Leishmania was used in vitro culture. To determine the effect of the extract on macrophage, cytotoxicity MTT assay was performed and CC50 was calculated. In order to investigate the Leishmania tropica amastigots glutamimn resistance with different concentrations of olive leaf aqueous extract, i.e. 0.31, 0.625, 1.25, and 2.5mg/ml and olive leaf hydroalcoholic extract with different concentrations of 3.1, 6.25, 12.5, 25 µg/ml were incubated for 24-72 hours. Geimsa stain was used as positive and negative controls, respectively.*

Results: *We found that 2/5mg/ml olive leaf aqueous extract and 25 µg/ml hydroalcoholic extract in 72 hours are the most effective concentration and time. It is important to note that olive leaf aqueous and hydroalcoholic extract did not have any effect on Leishmania tropica Glucantime resistance in vitro ($p \leq 0.05$).*

Conclusion: *The natural products are available and safe and can be used as a drug model without side effects, especially on amastigots of Leishmania tropica glutamimn sensitivity.*

Keywords: *Aqueous Extract; Hydroalcoholic Extract; Amastigot, Macrophage; Leishmania Tropica*

** Corresponding Author: Zahra Poursafavi*
Email: zahrapoursafavi@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۷، صفحات ۴۶ تا ۵۱

اثر عصاره آبی و هیدروالکلی برگ زیتون *(Olea europaea)* بر اماستیگوت‌های لیشمانیا ترویپیکای حساس و مقاوم به گلوکانتیم در شرایط (In vitro)

زهرا پورصفوی[1*]، سید جواد سید طبایی[1]، فرناز خیراندیش[2]، مهدی محبعلی[3]، محمد کمالی‌نژاد[1]، رضوان وجدیان[1]

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
۳- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۵/۱۰/۵ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۶/۷/۱۳

چکیده:

سابقه وهدف: باتوجه به اینکه درمان اصلی لیشمانیازیس، ترکیب‌های آنتی مو آن مانند پنتوستام و گلوکانتیم است به همین دلیل این تحقیق به روش تجربی انجام شد. مقاومت دارویی بیماران به این ترکیبات خصوصا در مناطق اندمیک مشکل اصلی این بیماری است، داروهای با منشأ گیاهی می‌توانند به مرور جایگزین مناسبی باشند. به همین دلیل در پژوهش حاضر تاثیر عصاره گیاهی برگ درخت زیتون که از گیاهان بومی کشور است، بر آماستیگوت‌های لیشمانیا ترویپیکای حساس و مقاوم به گلوکانتیم در شرایط آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۴ بررسی شد.

روش بررسی: یک نمونه مقاوم به گلوکانتیم از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و ادامه کار در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی کشت داخل سلولی انگل از ماکروفاژهای صفاق موش *BALB/c* انجام شد. در مرحله بعد اثر سایتو توکسیسیتی عصاره روی ماکروفاژهای سالم توسط تست *MTT* بررسی شد و غلظت‌های مناسب توسط محاسبه *CC50* به دست آمد. کاهش رشد انگل در داخل ماکروفاژ و همچنین کاهش درصد ماکروفاژهای آلوده شده، سپس اثر عصاره آبی و هیدروالکلی برگ درخت زیتون بارنگ‌آمیزی گیمسا تعیین و به این وسیله میزان رشد انگل در مقابل این ترکیب‌های در حالت *In vitro* مشخص شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های *T test* و *ANOVA* و آزمون توکی تجزیه و تحلیل آماری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این بررسی نشان دادکه ترکیب ۵ ظرفیتی آنتی مو آن (گلوکانتیم) باغلظت۲۵میکروگرم در میلی‌لیتر به طور معناداری باعث کاهش تکثیر داخل سلولی انگل لیشمانیا ترویپیکای حساس به دارو شد، اما روی نمونه مقاوم به گلوکانتیم تاثیری مشاهده نشد($p\leq$ ۰/۰۵).عصاره آبی در غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر و عصاره هیدروالکلی برگ درخت زیتون در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در روز سوم باعث از بین بردن تمام آماستیگوت‌های لیشمانیا ترویپیکای حساس به گلوکانتیم درون ماکروفاژها شد.

نتیجه‌گیری: : به نظر می‌رسد این عصاره در از بین بردن انگل لیشمانیا ترویپیکای حساس به گلوکانتیم درون ماکروفاژ و محیط کشت فعالیت ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد. نتایج حاصله به احتمال بی‌تاثیر بودن عصاره آبی و هیدرو الکلی برگ درخت زیتون روی انگل لیشمانیا ترویپیکای مقاوم به گلوکانتیم است. با این حال استفاده از سایر مشتقات زیتون نیز به دلیل اثر بخشی آن روی فرم حساس به دارو توصیه می‌شود. با توجه به قابل دسترس بودن و هزینه پایین این عصاره برای مطالعه‌های *In vivo* توصیه می شود. همچنین آزمایش‌های بیشتری برای ارزیابی این عصاره روی انگل لیشمانیا در مدل‌های حیوانی و افراد داوطلب توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: عصاره آبی ، عصاره هیدرو الکلی، لیشمانیا ترویپکا، برون تنی

مقدمه:

لیشمانیازیس توسط تک یاخته‌ای تاژک‌دار به نام لیشمانیا راسته کینتوپلاستیدا از خانواده ترپیانوزومیده ایجاد می شود(۱). انگل لیشمانیا در خون و بافت زندگی می‌کند، در بدن مهره‌داران درون سلول‌های بیگانه‌خوار تک هسته‌ای ، سلول‌های سیستم رتیکولواندوتلیال، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و دیگر سلول‌های بیگانه‌خوار به شکل آماستیگوت و در بدن پشه خاکی و محیط کشت به صورت خارج سلولی و به شکل

نویسنده مسئول: زهرا پورصفوی
پست الکترونیک: *zahrapoursafavi@yahoo.com*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

پروماستیگوت مشاهده می‌شود(۲). ایجاد زخم‌های بد شکل و طولانی‌مدت در مناطقی از بدن مانند صورت و ایجاد آلودگی‌های ثانویه در این بیماری، درمان آن را ضروری می‌سازد. درمان اصلی این بیماری ترکیب های آنتی موان شامل گلوکانتیم یا مگلومین آنتی موان (Meglumine antimonate) و سدیم استیبوگلوکونات (Sodium stibogluconate) یا پنتوستام است که از سال ۱۹۱۱تاکنون در بیشتر مناطق دنیا به عنوان بهترین نوع درمان شناخته شده است(۳, ۴). این داروها به دلیل تکرار عمل تزریق و دوز بالا علاوه بر تحمیل خسارت اقتصادی بر خانواده‌ها به بروز عوارض جانبی مانند اختلالات کبدی، قلبی و بیوشیمیایی منجر می‌شود ولی گزارش‌های متعدد کلینیکی در مناطقی که بیماری به صورت اپیدمیک یافت می‌شود حاکی از افزایش بیماران مقاوم نسبت به مواد دارویی مذکور است(۴). شواهدی در دست است که نشان می‌دهد مقاومت به علت پیدایش سوش‌های مقاوم بر ترکیب‌های آنتی موان و ایجاد موتاسیون‌های ژنتیکی به ویژه موتاسیون نقطه‌ای فوق‌الذکر است(۵). دیگر مطالعه‌ها نشان دادند که بروز مقاومت به داروهایی از جمله ترکیب‌های آنتی موان به دلیل درمان ناقص یا ناکافی بیماران بوده که در بعضی از آن‌ها باعث عود بیماری شده است(۳). مطالب فوق لزوم تحقیق‌های بیشتر روی داروهای جایگزین موثر و غیر سمی با هزینه پایین تر، برای درمان این بیماری را نشان می‌دهد. در حال حاضر ازگیاهان دارویی برای درمان لیشمانیازیس پوستی استفاده می‌شودکه از میان آن‌ها می‌توان به برگ درخت زیتون اشاره کرد(۹). این گیاه، طی مطالعه‌ای در یونان، فعالیت ضد لیشمانیایی مطلوبی از خود نشان داده است(۹). برگ زیتون غنی از یک ماده تلخ بنام اولئوروپئین است و اثر درمانی آن به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی به خوبی شناخته شده است(۱۰). تحقیقات نشان داده‌اند که ترکیب های پلی فنولیک که شبیه ترکیب‌های فنلی عصاره زیتون است، روی تریپانوزوما بروسئی، پریپانوزوما کروزی و لیشمانیا دنوانی خاصیت ضد لیشمانیایی و ضد تریپانوزومیایی دارد.

در این مطالعه سعی شده است اثر ضد انگلی عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه زیتون بر لیشمانیا ترو پیکای مقاوم و حساس به گلوکانتیم در شرایط in vitro در داخل ماکروفاژهای صفاقی موش بررسی شود. یک نمونه بیمار در دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه و تایید شد و مراحل بعدی تحقیق‌ها در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه به صورت تجربی در گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال ۱۳۹۴ انجام شد. برای انجام این کار تحقیقی مواد مختلفی تهیه و با استفاده از روش‌های استاندارد نسبت به پیگیری مراحل مختلف اقدام شد.

۱- تهیه نمونه لیشمانیا ترو‌پیکای مقاوم به گلوکانتیم

از پسر ۱۶ ساله ساکن مشهد که دارای زخم فعال حاوی انگل لیشمانیا در ناحیه بینی بود در دانشگاه علوم پزشکی تهران نمونه‌گیری انجام شد. بیمار بیش از ۸۰۰ واحد گلوکانتیم مصرف کرده بود و مقاوم بودن این انگل در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به تایید رسیده بود. ابتدا سطح زخم توسط سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو و با پنبه الکل ضد عفونی شد. سپس توسط واکسینواستیل در کناره‌های زخم خراش کوچک داده شد و بدون خونریزی سروزیته‌ای بی‌رنگ خارج شد. در مرحله بعد ادامه کار در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد و ازاین مایع برای تایید آماستیگوت در زخم، یک لام تهیه و با گیمسا رنگ‌آمیزی و در محیط RPMI شرکت Ato cell نیز کشت داده شد. مایع سروزیته را داخل محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ کامل برده ودر انکوباتور یخچال‌دار با دمای ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد(۱۱).

۲- انجام PCR-RFLP برای تأیید گونه نمونه‌گیری شده از بیمار

استخراج DNA از پروماستیگوت کشت داده در محیط RPMI۱۶۴۰ به وسیله کیت شرکت Roche انجام شد. PCR-RFLP روی ژن (Internal Transcribed Spacer 1) ITS-1 انجام و گونه انگل لیشمانیا ترو‌پیکا تایید شد(۱۲).

۳- کشت سویه استاندارد لیشمانیا ترو‌پیکای حساس به گلوکانتیم

سویه استاندارد MHOM/IR/99/YAZ1 لیشمانیا ترو‌پیکا از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای کنترل سوش مقاوم تهیه شد، ابتدا پروماستیگوت‌های لیشمانیا ترو‌پیکا در محیط RPMI-۱۶۴۰همراه ۱۰درصد FBS شرکت (شرکت Ato cell) و ۱۰۰ Iu/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتو مایسین (شرکت Ato cell) در دمای ۱۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و پس از رسیدن آن‌ها به فاز لگاریتمی رشد تعداد آن‌ها با لام نئو بار به 1×10^6 cell/ml تعدیل شد.

۴- تهیه عصاره آبی از برگ گیاه زیتون

دراین بررسی عصاره برگ گیاه زیتون با نام علمی *Olea europae* از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی زیرنظرمهندس محمدکمالی نژاد، پژوهشگر دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جمع آوری شد .۳۰۰گرم از برگ‌های خشک شده زیتون را پس از آسیاب کردن، به دو لیتر آب مقطری که جوش آمده اضافه شد و سریع ظرف از روی حرارت بر داشته و در ظرف با فویل پوشانده شد. پس از گذشت ۴ ساعت محتویات ظرف به کمک کاغذ صافی در محیط آزمایشگاه صاف و ظرف حاصل روی بن ماری قرار داده شد، پس از تبخیر حلال، ۱۰۰ گرم عصاره خشک حاصل شد.

۵- تهیه رقت‌های مختلف از عصارهآبی برگ درخت زیتون

از عصاره آبی برگ زیتون غلظت‌های ۰/۳۱۰، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر تهیه شد.

۶- تهیه عصاره هیدروالکلی برگ زیتون

ابتدا برگ ها را خشک و سپس آسیاب کرده تا به صورت پودر نرم درآمدند. سپس به آن‌ها استون اضافه شد و به مدت ۱۰ساعت تحت به هم زدن‌های شدید قرار گرفت. این عمل دوبار تکرار شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه رتاری تغلیظ شد . پودر در دمای محیطی خشک شد. پس از خشک شدن، پودر حاصل با محلول دی کلرومتان و متانول با نسبت ۹۸:۲ شسته شد. عصاره آبی و هیدروالکلی حاصل تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، دور از نور نگهداری شد.

۷- تهیه رقت‌های مختلف از عصاره هیدروالکلی برگ درخت زیتون

از عصاره هیدروالکلی برگ زیتون غلظت‌های ۳/۱، ۶/۲۵، ۱۲/۶، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد.

۸- جدا کردن ماکروفاژ از مایع صفاق موش

برای تهیه ماکروفاژ در این تحقیق از موش‌های نژاد BALB/c استفاده شد. سپس با رعایت نکات اخلاقی در قسمت کار با حیوان با روش cervical dislocation موش کشته شد و بلافاصله در شرایط کاملا استریل و زیر هود لامینار پوست روی شکم موش را با پنس و قیچی استریل شکاف داده و سپس ۵ میلی‌لیتر محیط RPMI-۱۶۴۰ سرد را با دقت زیاد به حفره صفاق تزریق کردیم. سپس با سرنگ استریل، محیط کشت دوباره به میزان تزریق شده داخل سرنگ کشیده شد و در داخل لوله‌های استریل انتقال داده شد . سپس محیط کشت حاوی سلول‌های جمع‌آوری شده از صفاق موش در دور g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب سلولی شمارش شد، سپس درصد زنده بودن سلول‌ها قبل از استفاده با رنگ‌آمیزی تریپان بلو بررسی شد.

۹- بررسی اثر سایتوتوکسیتی عصاره برگ زیتون روی ماکروفاژ پریتونئال موش

برای تعیین اثر سایتوتوکسیتی عصاره روی ماکروفاژهای سالم آزمون MTT شرکت fermentase انجام شد. تست MTT یک روش رنگ‌سنجی است که میزان تترازولیم به فورمازان توسط آنزیم‌های میتوکندریال در سلول زنده را بررسی می‌کند. در طی مدت انکوباسیون محلول MTT با سلول، آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری ، تترازولیم احیا میشود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی فورمازان میشود که در زیر میکروسکوپ قابل تشخیص هستند. مقدار رنگ تولید شده با سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد(۱۳).

ماکروفاژهای به دست آمده از پریتوئن موش در پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

کشت سلول و در حضور RPMI۱۶۴۰ حاوی۱۰درصد F.B.S ، ۱۰۰U/mL penicillin، ۱۰۰µg/m Streptomycine ریخته شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵درصد CO_2 انکوبه شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت ماکروفاژ، ماکروفاژهایی که به بستر نچسبیده بودند با PBS گرم (۳۷درجه سانتی‌گراد)، شست‌وشو داده شدند و سپس در حضور غلظتهای مختلف عصاره آبی با غلظت‌های ۰/۳۱۰، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵میلی گرم بر میلی‌لیتر و عصاره هیدرو الکلی برگ زیتون با غلظت‌های ۳/۱، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر انکوبه شدند. پلیتها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با $CO_2$5% برای ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت نگهداری شدند. ماکروفاژ و محیط کشت RPMI ده درصد به عنوان گروه کنترل استفاده شدند. در ضمن هر مجموعه تست و کنترل به صورت سه بار تکرار انجام شد و بعد از گذشت زمانهای۲۴، ۴۸ و۷۲ساعت تست MTT به صورت جداگانه انجام شد.

محلول MTT را با غلظت ۵ (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به عنوان محلول استوک تهیه کرده و ۱۰ میکرولیتر برداشته به همراه ۹۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI بدون فنل رد و FBS ۱۰درصد به هر چاهک حاوی 10^5 سلول ماکروفاژ اضافه شد. پلیتها به مدت۴تا۶ساعت در محیط تاریک با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. درپایان به چاهک‌ها ۱۰۰میکرولیتر DMSO اضافه شد و سپس میزان رنگ تولید شده در چاهکها با دستگاه ElisaReader در طول موج ۵۷۰ نانومتر، جذب نوری قرائت شد و با سلول‌های کنترل که زنده بودند مقایسه شد. در پایان رقت‌هایی که برای ماکروفاژ سالم توکسیک نبودند انتخاب شد(۳و۴).

۱۰-آلوده‌سازی ماکروفاژ به لیشمانیا واثر عصاره روی انگل‌های حساس و مقاوم به دارو:

برای هر غلظت پلیت چهار قسمتی در نظر گرفته و در هر خانه یک لامل قرار داده شد. (۳ خانه حاوی ماکروفاژ و غلظت مورد نظراز عصاره ها و یک خانه جهت کنترل ماکروفاژ سالم).سپس بر روی هر لامل ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی صفاقی حاوی 1×10^5 سلول در هر میلی لیتر اضافه شد و تا ۵ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌های ماکروفاژ به کف پلیت بچسبند. سپس مایع رویی خارج و محیط RPMI کامل اضافه و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. قبل از افزودن انگل باید محلول روی لامل‌ها را جمع‌آوری کنیم. پس از گذشت ۲۴ ساعت نوبت اضافه کردن آنگل به ماکروفاژها است که به ازای هر ۱ ماکروفاژ ۱۰ انگل اضافه شد. پلیت ها را به مدت ۶ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. طی این مدت RPMI حاوی ۱۰درصد FBS و پنی سیلین و استرپتومایسین را درون بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا دمای همگی یکنواخت شود زیرا تفاوت دما بین محیطها و پلیتها باعث ایجاد شوک در ماکروفاژها و کنده شدن آن‌ها از روی لامل می‌شود. سپس توسط RPMI، خانه‌های هر پلیت شست‌وشو داده شد. در مرحله بعد به هر خانه مقدار ۲ میلی‌لیتر عصاره با غلظت‌های مورد نظر به همراه RPMI که حاوی پنی سیلین و استرپتومایسین و ۱۰درصد F.B.S اضافه و. پلیت‌ها درون انکوباتور قرار داده شد.

۱۱-بررسی تاثیر عصاره روی نمونه‌ها

۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت پس از کشت، پلیت‌های مورد نظر از انکوباتور خارج شدند. سپس لامل‌ها با گیمسا رنگ آمیزی شد و آماستیگوت‌ها در ۱۰۰ عدد ماکروفاژ شمارش شد. نتایج توسط نرم افزار spss و آزمون Tukey HSDa,b ارزیابی شد.

یافته‌ها:

در این مطالعه غلظت‌های۰/۳۱۰ ، ۰/۶۲۵ ، ۱/۲۵ ، ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیترعصاره آبی و غلظت‌های ۳/۱، ۶/۲۵ ، ۱۲/۵ ، ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی برگ درخت زیتون روی تعداد آماستیگوت های لیشمانیا تروپیکای حساس و مقاوم به گلوکانتیم درون ماکروفاژهای صفاق موش در محیط RPMI در سه روزمتوالی مقایسه شدند .

غلظت۵ /۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی و غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی در روز سوم در جدول نشان می‌دهد که باعث حذف کامل آماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکای حساس به گلوکانتیم در ماکروفاژهای درون محیط کشت RPMI شد. تعدادانگل‌ها در روز اول ، دوم و سوم در نمونه‌های مقاوم به گلوکانتیم کاهش قابل توجهی نشان ندادند اما در روز سوم در هر دو عصاره به حداکثر تعداد خود رسیده بودند و به لحاظ آماری این دو عصاره تفاوت معناداری با هم نداشتند(P≤ ۰,۰۵).

روز اول تاثیری روی کاهش تعداد آماستیگوت‌های حساس به گلوکانتیم در هر دو عصاره مشاهده نشد اما تغییرات محسوس از روز دوم به بعد روی آماستیگوت‌های حساس به گلوکانتیم قابل توجه بود. به طوری که تعداد آماستیگوت‌های حساس به گلوکانتیم تحت تاثیر عصاره آبی با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و عصاره آبی با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روز سوم به صفر رسید و تمام آماستیگوت‌ها در غلظت های ذکر شده از بین رفتند ، اختلاف مشاهده شده از لحاظ آماری معنادار است(P≤ ۰,۰۵).

مقایسه درصد ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت حساس و مقاوم به گلوکانتیم در محیط کشت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و هیدروالکلی به تفکیک روز های آزمایش نشان داد، غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره هیدروالکلی و غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی در کاهش یا محو کامل ماکروفاژهای آلوده به طور معناداری نسبت به سایر غلظت‌ها از تاثیر بیشتری برخوردار است.

از دیگر یافته‌ها مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و هیدروالکلی با گلوکانتیم بود. در این مطالعه از لحاظ آماری اختلاف معناداری بین تاثیر عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ درخت زیتون با گلوکانتیم مشاهده نشد(P≤ ۰,۰۵).

همچنین در مقایسه‌ای که روی تاثیر عصاره آبی با هیدروالکلی برگ درخت زیتون انجام شد از لحاظ آماری معنادار نبود (P≤ ۰,۰۵).

بحث:

در سال‌های اخیر تاثیر ضد لیشمانیایی عصاره برگ درخت زیتون روی انگل لیشمانیا توسط محققان متعددی بررسی شده است اما در حال حاضر داروی مصرفی برای

جدول۱- تاثیر عصاره آبی و هیدروالکلی برگ درخت زیتون بر تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکای حساس به گلوکانتیم در محیط کشت RPMI

عصاره	غلظت	تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا			
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	p value
آبی برگ درخت زیتون	۰/۳۱۰ mg/ml	۴۶/۱±۳۳/۲۴۷۲	۸۱۶۴,۰±۴	۴۷۱۴,۰±۴,۳۳	<۰,۰۵
	۰/۶۲۵ mg/ml	۰,۴۷۱۴±۶۶,۴۹	۰,۴۷۱۴±۱,۳۳	۱	
	۰/۲۵ mg/ml	۰,۴۷۱۴±۵۱,۶۶	۱	۰	
	۲/۵ mg/ml	۰,۸۱۶۴±۴۰	۰,۴۷۱۴±۰,۳۳	۰	
هیدروالکلی برگ درخت زیتون	۳/۱ µg/ml	۰,۴۷۱۴±۴۸,۳۳	۰,۴۷۰۵±۱,۴۷	۰,۴۲,۵۴±۱,۲۹	<۰,۰۵
	۶/۲۵ µg/ml	۱,۲۴۷۴±۵۱,۶۶	۰,۴۷۱۴±۱,۳۳	۰,۴۷۱۴±۰,۳۳	
	۱۲/۵ µg/ml	۰,۴۷۱۴±۳۹,۶۶	۰,۴۷۱۴±۰,۳۳	۰	
	۲۵ µg/ml	۰,۸۹۱۰±۴۰,۰۱	۰,۴۵۹۰±۰,۴۱	۰	

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

جدول۲- تاثیر عصاره آبی و هیدروالکلی برگ درخت زیتون بر تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکای مقاوم به گلوکانتیم در محیط کشت RPMI

عصاره	غلظت	تعداد آماستیگوت های لیشمانیا			
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	p value
آبی برگ درخت زیتون	۰/۳۱۰ mg/ml	۱,۲۴۷۲±۴۵,۶۶	۰,۸۱۶۴±۸۵	۳,۸۵۸۶±۹۰,۶۶	<۰,۰۵
	۰/۶۲۵ mg/ml	۰,۸۱۶۴±۴۸	۱,۲۴۷۲±۸۳,۶۶	۱,۶۹۹۶±۹۸,۰۳	
	۰/۲۵ mg/ml	۱,۶۹۹۶±۵۲,۶۶	۱,۲۴۷۲±۸۵,۶۶	۲,۶۲۴۶±۹۹,۶۶	
	۲/۵ mg/ml	۱,۲۴۷۲±۴۳,۶۶	۱,۲۴۷۲±۸۵,۳۳	۰,۴۷۱۴±۹۸,۳۳	
هیدروالکلی برگ درخت زیتون	۳/۱ µg/ml	۰,۸۱۶۴±۴۸	۱,۲۴۷۲±۸۳,۶۶	۱,۶۹۹۶±۹۷,۳۳	<۰,۰۵
	۶/۲۵ µg/ml	۱,۶۹۹۴±۵۲,۶۶	۱,۲۴۷۲±۸۵,۶۶	۲,۶۲۴۶±۹۹,۶۶	
	۱۲/۵ µg/ml	۱,۲۴۷۴±۴۳,۶۶	۱,۲۴۷۲±۸۵,۳۳	۰,۴۷۱۴±۹۸,۳۳	
	۲۵ µg/ml	۱,۲۵۵±۴۰,۳۲	۱,۲۳۶۰±۸۳,۲۶	۰,۲۵۸۰±۹۴,۳۵	

درمان نوع جلدی، گلوکانتیم است. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی برگ درخت زیتون در شرایط آزمایشگاهی با غلظت ۵ /۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر و عصاره هیدروالکلی برگ درخت زیتون در شرایط آزمایشگاهی باغلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۷۲ ساعت باعث حذف کامل اماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکای حساس به گلوکانتیم شد. همچنین تعداد انگل‌ها در روز اول، دوم و سوم در نمونه‌های مقاوم به گلوکانتیم کاهش قابل توجهی نشان ندادند و با افزایش غلظت عصاره‌ها، اثر مهاری روی آماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکای حساس به گلوکانتیم افزایش می یابد اما در نمونه های مقاوم تاثیر چشمگیری مشاهده نشد. مطالعات فراوانی نیز در سال‌های اخیر بر روی آثار عصاره برگ درخت زیتون بر لیشمانیا انجام شده است که محققان معتقدند تاثیر آن بر انگل لیشمانیا از طریق سیستم ایمنی انجام می‌شود. در مطالعه‌ای که Juannis Kyriasis در سال ۲۰۱۳ انجام داد اثر مشتقات حاصل از برگ زیتون در شرایط برون تنی روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم، لیشمانیا دنووانی و لیشمانیا ماژور را بررسی کرد. نتایج او نشان داد که اولئوروپین و هیدروکسی تیروزول بیشترین اثر کشندگی را روی لیشمانیا دنووانی و لیشمانیا اینفانتوم داشتند در حالی که داروهای شیمیایی مانند پارومومایسین و میلتوفوسین تعداد پروماستیگوت‌ها را در هر سه گونه کاهش می دهد(۱۴). همچنین Lee oh thwan و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطالعه‌ای روی فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبیال عصاره فنولی برگ درخت زیتون انجام دادند. یافته‌های آنها نشان داد که اولئوروپین و کافئیک اسید موجود در این عصاره فعالیت شبه آنزیم سوپر اکسید دسموتاز دارند و توانایی حذف رادیکال‌های آزاد و آنتی میکروبیال دارد(۱۰). آقای Inse sifavo و همکارانش در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای برای ارزیابی عملکرد عصاره الکلی واریته‌های مختلف گیاه برگ درخت زیتون روی پروماستیگوت‌های L.tropica ، L.donovani ، L.amazonensis و L.major در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتایج حاصل از مطالعه آنها نشان داد که واریته‌ای از گیاه توانست روی پروماستیگوت سویه مختلف انگل اثر کشندگی بیشتری داشته باشد که بیشترین ترکیب فنلی را داشت(۹). در مطالعه دیگری Tasdemir و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در یک بررسی اثر فلاونوئید که در ترکیب‌های پلی فنولیک که شبیه ترکیب‌های فنلی عصاره برگ درخت زیتون است را روی تریپانوزروم بروسئی و تریپانوزوم کروزی و لیشمانیا دنووانی در شرایط برون تنی و درون تنی ارزیابی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب‌های فلاونوئید اثر ضد لیشمانیایی و ضد تریپانوزومایی دارد(۱۵). بنابراین استفاده از عصاره برگ گیاه زیتون می‌تواند باعث از بین بردن انگل لیشمانیا شده وپیشنهاد می‌شود برای درمان استفاده شود.

همچنین تحقیق‌های بیشتری روی مواد موثره خالص شده حاصل از برگ درخت زیتون روی نمونه‌های مقاوم به دارو نیز توصیه می‌شود. با این حال بررسی‌های بیشتر در مورد این گیاه با توجه به مصرف گسترده آن در منطقه توصیه می‌شود که مطالعه‌های کامل‌تری روی اجزای گیاه و آثار ضد انگلی آن در طیف وسیعی انجام گیرد. بر اساس یافته‌های این مطالعه عصاره آبی و هیدروالکلی برگ درخت زیتون به ترتیب در غلظت‌های ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت باعث مهار رشد آماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکای حساس به گلوکانتیم می‌شود. بی‌تاثیر بودن این عصاره روی نوع مقاوم این انگل در آزمایش‌ها نیز مشاهده شد.

با توجه به اینکه تولید دارو از منابع گیاهی، نوعی خود کفایی علمی و کاهش وابستگی در کشور را به دنبال خواهد داشت. بنابراین گیاهان دارویی به طور بالقوه زمینه‌های تحقیق‌های علمی را با سهولت بیشتر فراهم می‌کند. امروزه توجه به گیاهان دارویی و تحقیق‌ها در این زمینه در کشورهای مختلف جهان رو به افزایش است. دلیل عمده این توجه آن است که گیاهان از قرن‌ها پیش مورد مصرف دارویی بوده‌اند و ا آثار درمانی و بی ضرر بودن آن‌ها در طول سالیان متمادی تجربه شده و به اثبات رسیده است(۱۴). از طرف دیگر اهمیت استفاده از گیاهان در این است که همراه با مواد موثره اصلی مواد دیگری نیز در آن‌ها وجود دارد که در بیشتر موارد اثر درمانی گیاه را تشدید کرده و حتی در بسیاری از موارد از سمیت و آثار ناخواسته آن جلوگیری می‌کند(۱۶)

منابع:

1. Nadim A, Aflatoonian M. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in the city of Bam, southeast Iran. Iranian Journal of Public Health. 1995;24(1-2):15-24.

2. Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran: B. Khorassan Part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen. Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales. 1975;69(2):140-3.

3. Ouellette M, Drummelsmith J, Leprohon P, Fadili K, Foucher A, Vergnes B, et al. Drug resistance in Leishmania. Leishmania after the genome, 1st ed Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. 2008:159-76.

4. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

development for leishmaniasis. Indian Journal of Medical Research. 2006;123(3):399.
5. Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. Journal of Medical Microbiology. 2007;56(2):143-53.
6. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resistance Updates. 2004;7(4):257-66.
7. Walton B, Peters W, Killick-Kendrick R. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. The leishmaniases in biology and medicine Volume II Clinical aspects and control. 1987:637-64.
8. Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Tropical Medicine & International Health. 2001;6(11):849-54.
9. Sifaoui I, López-Arencibia A, Martín-Navarro CM, Chammem N, Reyes-Batlle M, Mejri M, et al. Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of Leishmania species and their correlation with the antioxidant activity. Experimental parasitology. 2014;141:106-11.
10. Lee O-H, Lee B-Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract. Bioresource technology. 2010;101(10):3751-4.
11. Hatam G. Isolation and determination of Leishmania parasite Shiraz Medical publication. 1384.
12. Nasereddin A, Bensoussan-Hermano E, Schönian G, Baneth G, Jaffe CL. Molecular diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. Journal of clinical microbiology. 2008;46(9):2848-55.
13. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. Parasitology international. 2005;54(2):119-22.
14. Kyriazis JD, Aligiannis N, Polychronopoulos P, Skaltsounis A-L, Dotsika E. Leishmanicidal activity assessment of olive tree extracts. Phytomedicine. 2013;20(3):275-81.
15. Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(4):1352-64.
16. Andrewes P, Busch JL, de Joode T, Groenewegen A, Alexandre H. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51(5):1415-20.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]