

ارزیابی کشندگی عصاره ی الکلی و آبی گل همیشه بهار (*Calendula officinalis*) بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در شرایط آزمایشگاهی

ناهد ماسپی¹، فاطمه غفاری فر^{2*}، علی محمد بهرامی³، صیاد بسطامی نژاد¹، مرتضی شمسی⁴

- (1) گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
- (2) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
- (3) گروه پاتوبیولوژی، آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام
- (4) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

تاریخ پذیرش: 88/12/3

تاریخ دریافت: 88/5/20

چکیده

مقدمه: گل همیشه بهار از خانواده کاسنیان است که از آن در درمان اختلالات پوستی، درد و نیز به عنوان باکتری کش، ضد عفونی کننده و ضد التهاب استفاده شده است. در این مطالعه اثر کشندگی گل مزبور با غلظت های مختلف بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

مواد و روش ها: در ابتدا گل های خشک و خرد شده این گیاه با خیساندن در الکل 80% عصاره گیری شدند و با استفاده از دستگاه تبخیر، الکل آن تبخیر شد. غلظت های مختلف عصاره (125 µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml) در آزمایشگاه تهیه و تعداد 50/000 پروماستیگوت در هر چاهک پلیت 96 خانهای کشت داده شد؛ سپس 100 میکرولیتر از عصاره به هر چاهک اضافه گردید و به مدت سه روز در دمای 24 درجه انکوبه شد. تعداد انگل ها در هر چاهک بعد از 24، 48 و 72 ساعت با لام نتوبار شمارش و از محیط کشت RP بدون عصاره به عنوان شاهد استفاده گردید.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که عصاره مزبور در غلظت 500µg/ml تمام انگل ها را کشته و غلظت های کم تر، فعالیت ضد لیشمانیایی وابسته به دوز نشان دادند که IC₅₀ پس از 24 ساعت در عصاره الکلی و آبی به ترتیب 170 µg/ml و 215µg/ml به دست آمد. تعداد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شاهد در ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت به ترتیب افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری: براساس نتایج مطالعه کنونی، عصاره گل همیشه بهار اثر لیشمانیاکشی خوبی دارد و احتمالاً می تواند در درمان لیشمانیوز به کار رود.

واژه های کلیدی: لیشمانیا ماژور، گل همیشه بهار، عصاره گیاهی، *Calendula officinalis*

* نویسنده مسئول: گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

ماده آسیاب شده به ارلن حاوی 500 میلی لیتر الکل 80 درجه اضافه و به مدت 48 ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر الکل، دهانه ارلن با پارافیلیم بسته شد. سپس مایع شفاف رویی جدا و رسوب ته ارلن دور ریخته شد. مایع رویی به مدت 10 دقیقه با دور 2000rpm سانتریفوژ و مجدداً مایع رویی جداسازی و در دستگاه تقطیر در دمای 42 درجه سانتی گراد قرار داده شد تا الکل اضافی جدا شود. عصاره باقی مانده با غلظت 5 میلی گرم در میلی لیتر به عنوان محلول ذخیره تهیه گردید و تا زمان استفاده در دمای 4 درجه در ظروف تیره نگهداری شد.

تهیه عصاره آبی

این روش همانند تهیه عصاره الکلی است ولی به جای الکل از آب به عنوان حلال استفاده شد و پس از سانتریفوژ، مایع رویی با استفاده از دستگاه لیوفلیزه گردید و از عصاره باقیمانده محلول ذخیره با غلظت 5 mg/ml در محیط RPMI تهیه و تا هنگام استفاده در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

کشت انگل

پروماستیگوت‌ها لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ در 24 °C حاوی 10 درصد سرم جنین گوساله (FCS) و آنتی بیوتیک جنتامایسین کشت داده شد و پس از 72 ساعت از آن‌ها کشت بعدی صورت گرفت. در پی آن تهیه شد سپس پروماستیگوت‌های انگل در معرض غلظت‌های افزایشده همیشه بهار قرار گرفت و اثر کشندگی آن بر انگل‌ها بررسی شد.

ارزیابی اثر ضد لیشمانیایی عصاره

پروماستیگوت‌های فاز ایستایی لیشمانیا ماژور در میکروپلیت‌های کشت 96 خانه حاوی محیط کشت RPMI، 10 درصد سرم جنین گوساله و 100 µg/ml جنتامایسین کشت داده شد (5×10⁴ انگل در هر چاهک). سپس با 100µl از غلظت‌های مختلف عصاره همیشه بهار (500µg/ml، 250µg/ml، 125µg/ml، 62/5µg/ml) تیمار گردید. پروماستیگوت‌ها به مدت سه روز در 24 °C انکوبه شدند و تعداد پروماستیگوت‌های زنده در هر چاهک پس از روزهای اول، دوم و سوم با استفاده از لام نتوبار و میکروسکوپ شمارش گردید (از هر غلظت، سه چاهک شمارش شد). از محیط کشت RPMI بدون عصاره به عنوان شاهد استفاده شد.

لیشمانیوزها گسترش جهانی داشته و از مهم ترین بیماری‌های منتقله ی ناقلین به شمار می روند که عامل آن‌ها گونه های مختلف انگل جنس لیشمانیا می باشد. گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا منجر به لیشمانیوز جلدی، جلدی-مخاطی، احشایی و حتی بیماری سیستمیک شدیدی می‌شود که در صورت عدم درمان کشنده می‌باشد. این انگل در 88 کشور جهان، اعم از دنیای قدیم (عمدتاً شمال و شرق آفریقا، خاورمیانه، آسیا و جنوب اروپا) و دنیای جدید (مرکز و جنوب آمریکا) وجود دارد. شیوع جهانی لیشمانیوزها 12 میلیون نفر و بروز سالیانه آن 500 هزار مورد می‌باشد. (1)

مواد طبیعی یا ترکیبات مشتق از گیاهان به صورت گسترده ای در مقابله با میکروارگانیزم‌های بیماری زا به کار می‌روند، (2). گل همیشه بهار، از خانواده کاسنیان است که در درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها و در ترکیب با داروهای هموپاتیکی استفاده شده است، (3). و تاریخچه مصرف آن در پزشکی به قرن دوازدهم بر می‌گردد، (4). حتی از این گیاه به عنوان داروی سنتی در رژیم های غذایی استفاده شده است، (5). اخیراً به عنوان ضد التهاب برای استعمال خارجی و ترمیم زخم به صورت فزاینده‌ای استفاده می‌شود، (6،7،8). خواص دارویی فراوانی شامل آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد باکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی برای این گیاه گزارش شده است، (9،10،11،12). از طرفی به فعالیت سایتوتوکسیک و نیز کاهش تومور این گیاه نیز اشاره شده است، (13). مصرف خوراکی گل همیشه بهار را در افزایش قاعدگی، درمان تب و درمان سرطان موثر دانسته اند، (14). جوشانده همیشه بهار در شستن چشم‌ها، غرغره کردن یا درمان ورم ملتحمه، التهاب گلو، استوماتیت افتوس، التهاب دهان و لثه، راش‌های قنذاق و دیگر موارد التهابی پوست و غشاهای مخاطی استفاده شده است، (15،16). در هندوستان ترکیبات گیاهی حاوی گل همیشه بهار به طور موضعی و در درمان هموروئید به کار می رفته است، (17). فلانوتیدهای جدا شده از گل همیشه بهار دارای خاصیت ضد میکروبی بر استافیلوکوک اورئوس و کلبسیلا پنومونیه می‌باشند و عصاره آلی گل‌های خشک شده همیشه بهار باعث کاهش فعالیت HIV-1 reverse transcription می‌شود.

مواد و روش ها

آماده کردن عصاره الکلی گل همیشه بهار

گل‌های خشک همیشه بهار از عطاری خریداری و با استفاده از آسیاب برقی کاملاً خرد شد. سپس 50 گرم از

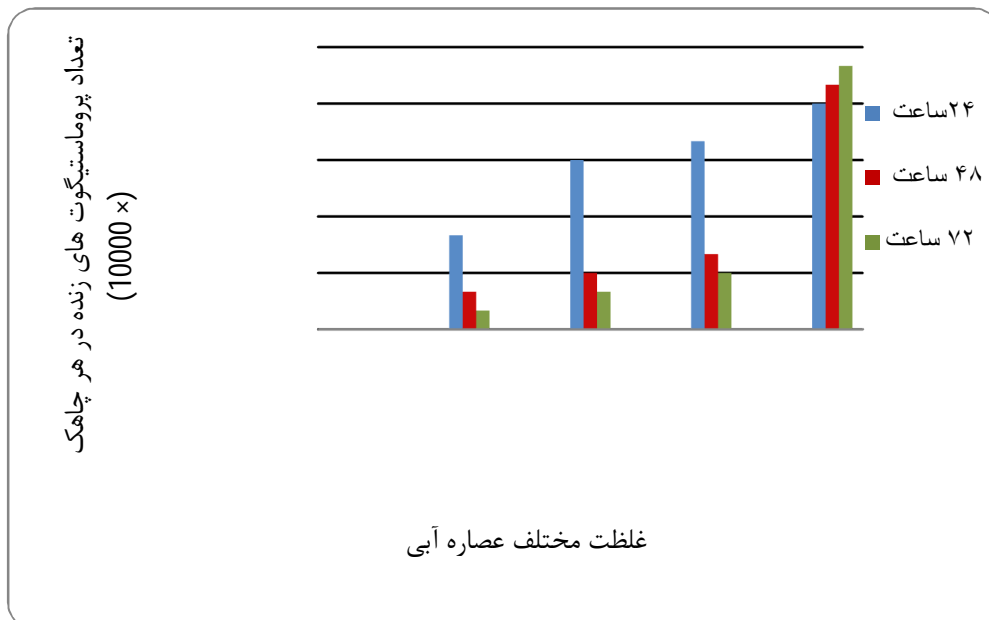
یافته‌های پژوهش

درصد پروماستیگوت‌های کشته شده با مقایسه میزان رشد گروه تیمار و شاهد سنجیده شد. درصد IC_{50} به عنوان غلظتی از عصاره که باعث 50 درصد مهار رشد پروماستیگوت‌ها پس از 24 ساعت می‌شود تعریف گردید. نتایج نشان داد که هر دو عصاره دارای اثر مهاری بر رشد پروماستیگوت‌ها بودند و غلظت مهاری 50 درصد به ترتیب برای عصاره الکلی و آبی 170 و 215 میکروگرم در میلی‌لیتر

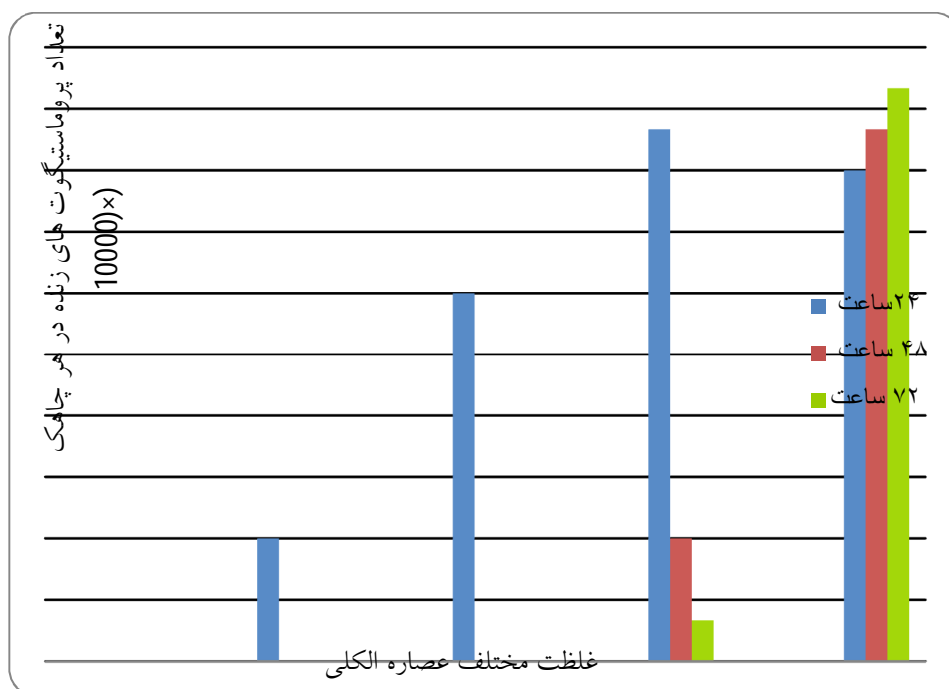
بود. در غلظت 500 $\mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی، پس از 24 ساعت، تمام پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور و در همین غلظت از عصاره آبی، 75 درصد پروماستیگوت‌ها کشته شدند و فعالیت لیثمانیا کشی وابسته به دوز در دوزهای پایین تر نیز دیده شد. اما تعداد پروماستیگوت‌ها در نمونه شاهد پس از 24، 48 و 72 ساعت به ترتیب سیر فزاینده‌ای داشت (جدول 1) که میانگین تعداد انگل‌ها در غلظت‌های مختلف پس از هر سه روز محاسبه گردید. (نمودار 1 و 2)

جدول 1. مقایسه اثر کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره ی الکلی و آبی گل همیشه بهار بر پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

غلظت‌های عصاره گیاهی ($\mu\text{g/ml}$)	درصد پروماستیگوت‌های کشته شده پس از مواجهه با عصاره گیاهی			نوع عصاره
	24 ساعت	48 ساعت	72 ساعت	
500	75	84/62	100	آبی
250	59	75	92/92	
125	25	55/55	85/72	
62/5	16/68	30/76	60	
500	100	100	100	الکلی
250	75	92/31	100	
125	37/5	77/78	90	
62/5	25	55/56	70	



نمودار شماره 1. تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گل همیشه بهار بر لیثمانیا ماژور پس از 24، 48 و 72 ساعت. (میانگین تعداد پروماستیگوت‌ها در هر چاهک)



نمودار شماره 2. تاثیر غلظت مختلف عصاره الکلی گل همیشه بهار بر لیشمانیا ماژور پس از 24، 48 و 72 ساعت. (میانگین تعداد پروماستیگوت ها در هر چاهک)

بحث و نتیجه گیری

پکانوم هارمالا و آلکانا تینکتورا را بر لیشمانیا ماژور در شرایط *in vitro* انجام دادند و دریافتند که هر دو عصاره دارای اثر مهاری بر پروماستیگوت ها بودند، (29). در این مطالعه از عصاره آبی و الکلی گل همیشه بهار استفاده شده که هر دو عصاره اثر مهاری بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور داشتند ولی تاثیر عصاره الکلی بیشتری بود. بیشترین میزان کشندگی در غلظت 500 میکروگرم در هر دو عصاره دیده شد در حالی که کمترین اثر کشندگی مربوط به غلظت 62/5 میکروگرم بود و تعداد انگل ها با افزایش زمان و افزایش غلظت در هر دو عصاره کاهش یافت بین تعداد انگل ها در گروه شاهد و گروه مورد اختلاف معنی دار آماری وجود داشت. بررسی متون و نتایج پژوهش کنونی نشان می دهند و این تحقیق که برخی ترکیبات طبیعی دارای اثرات ضد لیشمانیایی می باشند که انجام مطالعات بیشتر در زمینه اثر ضد لیشمانیایی گیاهان دارویی را می طلبد و تا بتوان از این ترکیبات در تهیه داروی موثر لیشمانیوز استفاده نمود.

سپاسگزاری

هزینه این طرح از اعتبارات کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است و با تشکر از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نموده اند.

لیشمانیوز بیماری وسیع الطیف انگلی است که کم و بیش از سراسر جهان گزارش می شود. تاکنون واکسن یا داروی مناسبی برای مهار انگل و نیز روش شیمیایی مناسبی در مبارزه قاطع با ناقل آن ارائه نشده است، (18-21). درمان مناسب لیشمانیوز به گونه ی لیشمانیای آلوده کننده و سندرم بالینی آن بستگی دارد، (22-23). داروهای آنتی-موان پنج ظرفیتی، سدیم استیوگلوکونات (پنتوستام) و مگلو مین آنتی-موان (گلوکانتیم) از جمله ی درمان های اصلی در چند دهه ی اخیر بوده اند و شکست درمانی روزافزونی افزایش یافته گزارش می گردد، (24-25). دکسی کولات آمفوتریسین B مؤثر اما نسبتاً سمی است، (26). و تاکنون هیچ درمانی کاملاً رضایت بخشی شناخته نشده است. استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری های انگلی به زمان های باستان بر می گردد که از *Cinchona succiruba* (Rubiaceae) به عنوان داروی ضد مالاریا استفاده شده است، (27). سن و همکاران در سال 2007 اثر لیشمانیا کشی گیاه آرتمیسینین تریاکس را بر پروماستیگوت های لیشمانیا دونووانی بررسی کردند و مشاهده نمودند که آرتمیسینین دارای اثر ضد لیشمانیایی بر پروماستیگوت ها و آماستیگوت ها بود، (28). در مطالعه دیگری یوسفی و همکاران در سال 2009 تاثیر کشندگی گیاهان

References

- ۱-Desjeux P. Leishmaniasis public health and control. Clin Dermatol ۱۹۹۶; ۱۴: ۴۱۷-۲۳.
- ۲-Vyvyvan JR. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. Tetrahedron ۲۰۰۲; ۵۸: ۱۶۳۱-۴۶.
- ۳-Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavec M, Della Loggia R, Tubaro A, et al. Anti-edematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.) J Ethnopharmacol ۱۹۹۷; ۵۷: ۱۳۹-۴۴.
- ۴-J Kathi MD, MPH Kemper. *Calendula* (*Calendula officinalis*). ۱۹۹۹; ۱-۱۳.
- ۵-Khodzhaeva MA, Turakhozhaev MT. Carbohydrates of *Calendula officinalis*. Chemistry of Natural Compounds ۱۹۹۳; ۲۹: ۵۳۳-۴.
- ۶-Bisset NJ. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm, Stuttgart and CRC, Boca Raton, Ann Arbor, London and Tokyo ۱۹۹۴; ۵۶۶.
- ۷-Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phytochemistry ۱۹۹۶; ۴۳: ۱۲۵۵-۶۰.
- ۸-Patrick KFM, Kumar S, Edwardson PAD, Hutchinson J. Induction of vascularization by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L., the European marigold. Phytomedicine ۱۹۹۶; ۳: ۱۱-۱۸.
- ۹-Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Antioxidant potential of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo. Pharmaceutical Biol ۲۰۰۶; ۴۴(۹): ۶۹۱-۷.
- ۱۰-Kasiram K, Sakharkar PR, Patil AT. Antifungal activity of *Calendula officinalis*. Indian J Pharm Sci ۲۰۰۰; ۶: ۴۶۴-۶.
- ۱۱-Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Issac O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula* flowers. Planta Med ۱۹۹۴; ۶۰: ۵۱۶-۲۰.
- ۱۲-Dumenil G, Chemli R, Balasard G. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis*. Ann Pharma Fran ۱۹۸۰; ۳۸: ۴۹۳-۹.
- ۱۳-Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. Pharmazie ۱۹۸۸; ۴۳: ۲۲۰-۱.
- ۱۴-Krag K. Plants used as contraceptives by the North American Indians: an ethnobotanical study. Botanical Museum Cambridge MA; Harvard University ۱۹۷۶: ۱۱۷۷.
- ۱۵-Montvale NJ, Fleming T. PDR for herbal medicines. Medical Economics Company Inc ۱۹۹۸.
- ۱۶-Mozherenkov VP, Shubina LF. Treatment of chronic conjunctivitis with *Calendula*. Med Sestra ۱۹۷۶; ۳۵: ۳۳-۴.
- ۱۷-Vijayasarathy V, sharma L, Prakash A. Indigenous drug treatment for hemorrhoids. Probe ۱۹۸۱; ۲۰: ۲۸۵-۷.
- ۱۸-Dumonteil E, McMahon-Pratt D, Price VL. Report on the fourth TDR/IDRI meeting on second generation vaccine against leishmaniasis. Merida, Yucatan, Mexico, May ۱-۳, ۲۰۰۱. Rev Biomed ۲۰۰۲; ۱۳(۱): ۵۳-۸.
- ۱۹-Brodskyn C, De Oliveira CI, Barral A, Barral- Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. Expert Rev Vaccines ۲۰۰۳; ۲(۵): ۷۰۵-۱۷.
- ۲۰-Reed SG. Leishmaniasis vaccination: targeting the source of infection. J Exp Med ۲۰۰۱; ۱۹۴(۳): ۳۳۱-۴۲.
- ۲۱-Wolff JA, Malone RW, Williams P, Ascadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science ۱۹۹۰; ۲۴۷(۴۹۴۹ Pt ۱): ۱۴۶۵-۸.
- ۲۲-Pearson RD and Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis ۱۹۹۶; ۲۲: ۱-۱۳.
- ۲۳-Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last ۱۰ years. Clin Infect Dis ۱۹۹۷; ۲۴: ۶۸۴-۷۰۳.
- ۲۴-Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am J Trop Med Hyg ۱۹۹۲; ۴۷: ۱۱۷-۲۶.
- ۲۵-Herwaldt BL and Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical

studies. Am J Trop Med Hyg ۱۹۹۲; ۴۶: ۲۹۶-۳۰۶.

۲۶-Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Barat D, Singh RK. Daily versus alternate-day regimen of amphotericin B in the treatment of kala-azar: a randomized comparison. Bull, World Health Org ۱۹۹۴; ۷۲: ۹۳۱-۶.

۲۷-Kayser O, Kiderlen A, Croft SL. Natural products as potential antiparasitic drugs, In: Atta-ur- Rahman (Hg.), Studies in Natural Products Chemistry, Part G: Bioactive Natural Products, Amsterdam:

Elsevier Science BV; ۲۰۰۲; ۲۶(۱۲): ۷۷۹-۸۴۸.

۲۸-Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani

Promastigotes. Medical Microbiology ۲۰۰۷; ۵۶: ۱۲۱۳-۱۸.

۲۹-Yousefi R, Ghaffarifar F, Dalimi Asl A. The effect of alkanna tincturia and peganum harmala extracts on leishmania major (MRHO/IR/۷۵/ER) in vitro. Iranian J Parasitol ۲۰۰۹; ۴(۱): ۴۵-۵۲.(Persian)

Evaluation of Leishmanicidal Effect of Watery & Ethanolic Flowers *Calendula officinalis* Extract on Promastigotes of *Leishmania Major* (MRHO/IR/75/ER) in Vitro

Maspi N¹, Ghafarifar F^{*2}, Bahrami AM³, Bastaminezhad S¹, Shamsi M⁴

(Received: 11 Aug. 2009

Accepted: 23 Feb. 2010)

Abstract

Introduction: *Calendula officinalis* is a member of Asteraceae family. *Calendula officinalis* is used for the treatment of skin disorders and pain. It is also applied as a bactericide, antiseptic or anti-inflammatory drug. In this study, the leishmanicidal effect of *Calendula officinalis* with various concentrations was evaluated on promastigotes of *L. major* in vitro.

Materials & Methods: The dried and ground flowers of the plant were extracted using maceration in 80% ethanol, and then the liquid was dehydrated in an evaporator. Afterwards, different concentrations of the extract (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml and 62.5 µg/ml) were prepared in vitro and 5×10⁴ promastigotes/well were seeded in a 96-well cell culture plate and was added 100µl of each extract/well. The plate was incubated at 24°C for three days and the number of parasites in each well was determined on 24h, 48h, and 72h of

experiment microscopically using Neubauer Chamber. RPMI culture medium was used as one negative control.

Findings: The extract at concentration of 500µg/ml was found to kill all the parasites. Lower doses exhibited a dose-dependent antileishmanial activity. However, the number of *L. major* promastigotes in the negative control increasingly grew on 24h, 48h, and 72h respectively. IC₅₀ was calculated for ethanolic & watery *Calendula officinalis*; 170µg/ml, 215µg/ml after 24h respectively.

Discussion & Conclusion: These results indicated that extract of *Calendula officinalis* is of favorable leishmanicidal activity and can be a candidate for leishmaniasis treatment.

Key words: leishmania major, *Calendula officinalis*, extract

1. Dept of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Science, Ilam, Iran

2. Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (corresponding author)

3. Dept of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran

4. Dept of parasitology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Science, Hamadan, Iran

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences