

بررسی تاثیر عصاره گونه های مختلف گیاه *Vinca* بر روی لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی*

دکتر مهدی آسمار^۱، دکتر صدیقه مهرابیان^۲، دکتر نورایر پیازک^۱، مهین فرهنگند^۱، دکتر احمد مجد^۲، سایه آگاه^۱، نوشین سیدصافی خان^۱، مریم مدبر^۱، سالومه مصلحی جنابیان^۱

واژه های کلیدی: وینکامینور، وینکاماژور، وینکاروزآ، وینکاواریگاتا، لیشمانیاماژور

چکیده

پیچ تلگرافی برگ ریز یا وینکامینور، پیچ تلگرافی برگ درشت یا وینکارماژور، پیچ تلگرافی برگ درشت ابلق یا وینکاواریگاتا و پروانش یا وینکاروزآ، چهار گونه متعلق به سرده وینکا و از تیره خرزهره می باشند. این گونه ها علاوه بر زینتی بودن، با داشتن آکالوئیدهای متنوع در گروه گیاهان دارویی نیز قرار می گیرند. هدف از این پژوهش، بررسی اثربخشی عصاره این گیاهان بر پروماستیگوت های لیشمانیاماژور در شرایط آزمایشگاهی بوده است. بدین منظور عصاره متانولی برگ و ساقه هر چهار گونه بر روی پروماستیگوت های لیشمانیاماژور اثر داده شد. (PH محیط در تمامی مراحل ثابت بوده است). نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره متانولی برگ و ساقه هر چهار گونه، با درجات مختلف باعث کاهش قابل توجهی در تعداد پروماستیگوت های لیشمانیاماژور می شود. به طوری که افزایش غلظت و افزایش زمان تماس موجب انهدام کل انگل ها می گردد. نتایج بدست آمده از نظر آماری در $P < 0/001$ معنی دار است.

سرآغاز

لیشمانیوز یک مشکل بهداشت جهانی بوده که سالانه بین ۲ تا ۳ میلیون نفر از مردم جهان را مبتلا می کند و حدود ۳۵۰ میلیون نفر از ۸۰ کشور دنیا به وسیله این بیماری تهدید می شوند. تعداد موارد لیشمانیوز گزارش شده از سراسر جهان، حدود ۱۲ میلیون نفر می باشد. در ایران سالانه شاهد موارد متعددی از لیشمانیوز، به خصوص لیشمانیوز جلدی ایجاد شده به وسیله لیشمانیاماژور می باشیم. آنتی موآن های ۵ ظرفیتی (SbV)، گلوکانتیم و پنتوستام داروهای رایج برای درمان بیشتر انواع لیشمانیوزها بوده در حالی که آمفوتریسین B و پتامیدین انتخاب های دوم درمان می باشند. درمان با این عوامل کاملاً موثر نبوده و همگی دارای عوارض جانبی شدید

* طرح پژوهشی شماره ۸۹۸۷ شورای پژوهشی انستیتو پاستور ایران که در تاریخ ۷۴/۱۱/۲۹ به تصویب رسید و بودجه پیشنهادی آن تامین گردید.

۱- گروه انگل شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران.

از جمله اثرات سمی بر روی کلیه ها و قلب می باشند (۱ و ۳). باتوجه به این مطلب برای جستجوی یک ماده ضد لیشمانیایی موثر در درمان لیشمانیوز جلدی به بررسی تاثیر عصاره های تهیه شده از چهار گونه گیاه وینکابر پروماستیگوت های لیشمانیامازور در شرایط آزمایشگاهی^۱ پرداختیم.

نمونه گیری و روش بررسی

برای انجام این تحقیق گیاهان وینکامینور^۲، وینکامازور^۳، وینکاواریکاتا^۴، وینکاروزا^۵، شناسایی و جمع آوری گردید و در شرایط مطلوب خشک شد سپس برگ ها و ساقه ها از هم جدا گردید و هر کدام جداگانه پودر شد. سپس مقداری از پودر برگ و ساقه بطور جداگانه با استفاده از متانول ۸۰٪ و دستگاه سوکسله عصاره گیری شده و متانول آن به کمک دستگاه تقطیر در خلاء دوار، تبخیر گشته و از عصاره حاصله رقت های ۱۵۰ و ۳۰۰ و ۴۵۰، ۶۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم ماده خشک در هر میلی لیتر در ۱٪ DMSO + PBS تهیه و سترون شد (۴ و ۲). سپس پروماستیگوت های لیشمانیامازور در مرحله ایستایی رشد همراه محیط RPMI غنی شده با سرم جنین گاوی ۱۰٪ در پلیت های ۲۴ خانه کشت سلولی کشت داده شد. به نحوی که تعداد پروماستیگوت ها در هر میلی لیتر از محیط^۵ $10 \times 1/5$ محاسبه شد. سپس از رقت های تهیه شده، در شرایط کاملاً سترون اضافه نموده و برای هر رقت سه تکرار در نظر گرفته شد و همچنین شاهد های بدون عصاره، داروی گلوکانتیم و داروی پنتوستام نیز به طور همزمان استفاده شده و تاثیر آن ها بر پروماستیگوت های انگل در زمان های مختلف ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی گردید. لازم به تذکر است که هر آزمون در سه نوبت تکرار شد.

یافته ها

عصاره های برگ و ساقه هر چهار گونه گیاهی در تمامی غلظت های مورد نظر برعلیه پروماستیگوت های لیشمانیامازور در محیط کشت با درجات مختلف موثر بوده است. اگر چه غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اثر ناچیزی بر پروماستیگوت ها نشان داد، غلظت ۷۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۹۶ ساعت سبب از بین رفتن و انهدام تمامی انگل ها شد. در طول مدت مشاهده تعداد انگل ها در شاهد بدون عصاره، رشد خوبی را از خود نشان داده و تا روز چهارم مشاهده شکل انگل ها کشیده و سالم به نظر می رسید. در صورتی که در غلظت های بالای عصاره بیشتر انگل ها متلاشی و یا گرد شده و سیتوپلاسم آنها دانه دار به نظر می رسید.

1- In vitro

3- Major

5- V. rosea

2- V. minor

4- V. variegata

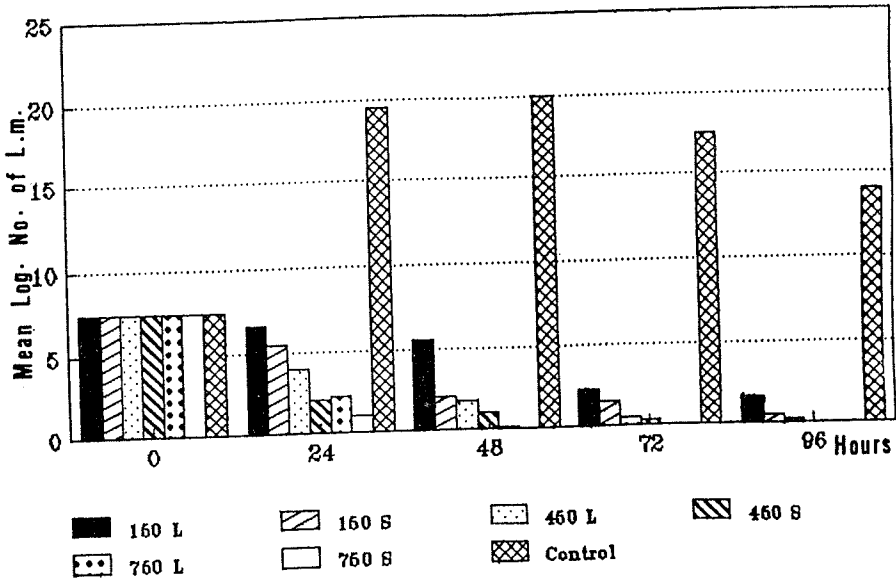
باتوجه به نگاره های تهیه شده از تاثیر غلظت های مختلف عصاره های برگ و ساقه تابستانه چهار گونه گیاه وینکا (نگاره های ۱ و ۲ و ۳ و ۴) پس از زمان های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ کلیه عصاره های برگ و ساقه در مقایسه با شاهد بدون عصاره و دو شاهد دارویی به نام گلوکانتیم و پنتوستام تاثیر قابل توجهی بر روی پروماستیگوت های *لیشمانیامازور* نشان داده ولی اختلاف های جزئی بین هر چهار گونه گیاهی در زمان ها و رقت های مختلف از عصاره مشاهده می شود. لازم به تذکر است که نتایج بدست آمده از آزمون های تاثیر عصاره متانولی برگ و ساقه زمستانه به دلیل مشابهت های نسبی در این مقاله ذکر نشده است.

گفتگو و بهره گیری پایانی

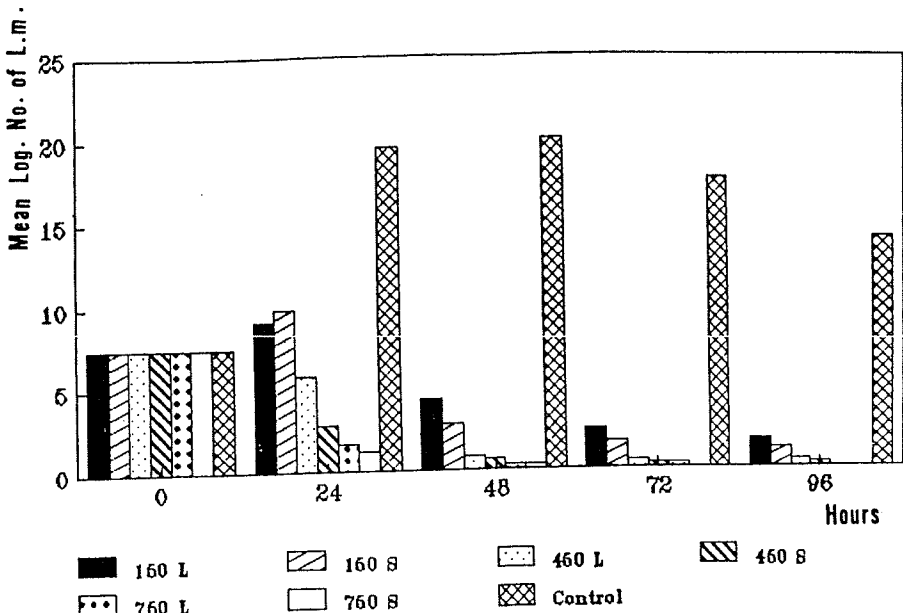
در مطالعه حاضر نشان داده شد که عصاره های بدست آمده از برگ و ساقه چهارگونه از گیاه وینکا در برابر پروماستیگوت های *لیشمانیامازور* با درجاتی مختلف اثر ضد لیشمانیایی از خود نشان می دهند در غلظت ۷۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از رشد انگل به سرعت جلوگیری شده و پس از ۹۶ ساعت تمامی انگل ها منهدم می شوند. براساس مطالعات آماری انجام شده در $P < 0/001$ تفاوت معنی داری در اثر بخشی بین عصاره های ساقه و برگ چهار گونه گیاهی مورد مطالعه بر پروماستیگوت های *لیشمانیامازور* دیده نشده همچنین به طور مشابه به جز در مورد ساقه گیاه وینکامینور و وینکامازور و وینکا و اریگاتا در $P < 0/001$ تفاوت معنی داری در تاثیر بین عصاره های برگ زمستانه و برگ تابستانه و ساقه زمستانه و ساقه تابستانه بر پروماستیگوت های *لیشمانیامازور* مشاهده نشد. بین اثربخشی دو داروی گلوکانتیم و پنتوستام بر پروماستیگوت های *لیشمانیامازور* در محیط کشت آزمایشگاهی از نظر آماری در $P < 0/001$ تفاوت معنی داری مشاهده شد و مشخص شد که داروی پنتوستام در این شرایط از گلوکانتیم موثرتر بوده و اثر ضد لیشمانیایی برگ و ساقه عصاره های نمونه های مختلف گیاه وینکا نسبت به دو داروی ذکر شده در شرایط مشابه به مراتب قوی تر بوده است.

سپاسگزاری

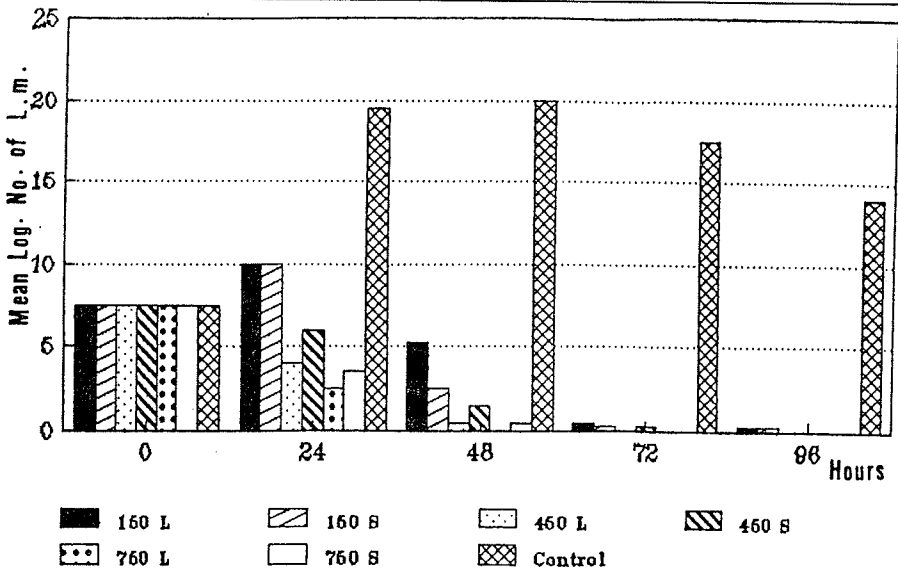
از جناب آقای دکتر امیرخانی برای کمک های ارزشمندشان در زمینه آمار و تهیه نگاره ها سپاسگزاریم.



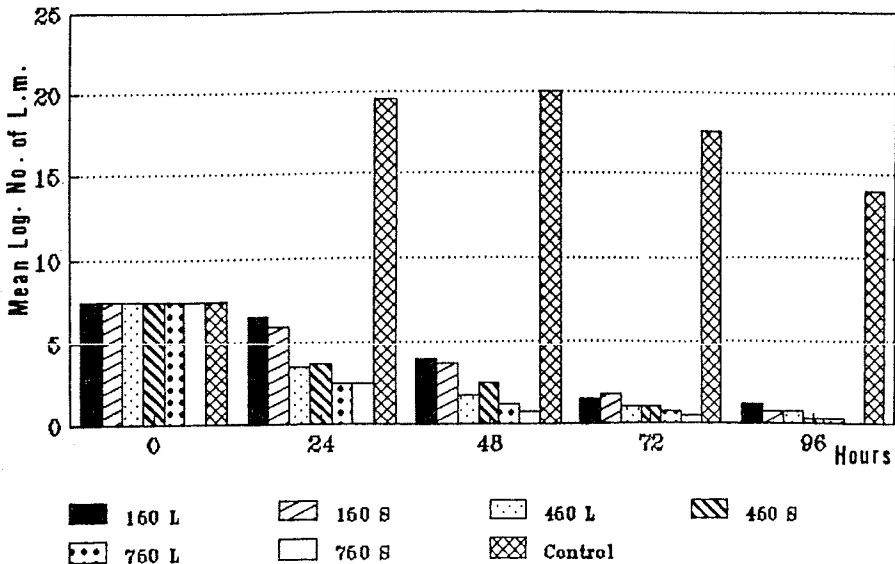
نگاره ۱ - میانگین تعداد پروماستیگوت های لیسمانیا مازور (۲۰,۰۰۰) بعد از تاثیر غلظت های مختلف عصاره برگ و ساقه وینکامازور در زمان های مختلف



نگاره ۲ - میانگین تعداد پروماستیگوت های لیسمانیا مازور (۲۰,۰۰۰) بعد از تاثیر غلظت های مختلف عصاره برگ و ساقه وینکامینور در زمان های مختلف



نگاره ۳ - میانگین تعداد پروماستیگوت های لیشمانیماژور (۲۰,۰۰۰) بعد از تاثیر غلظت های مختلف عصاره برگ و ساقه وینکارواریگاتا در زمان های مختلف



نگاره ۴ - میانگین تعداد پروماستیگوت های لیشمانیماژور (۲۰,۰۰۰) بعد از تاثیر غلظت های مختلف عصاره برگ و ساقه وینکاروزآ در زمان های مختلف

کتابنامه

- 1-Iwu , M.M. ; Jackson , J.E. and Schuster , B.G. (1994): Medicinal plants in the fight against *Leishmaniasis* , Parasitology today. 10 , 65-68.
- 2-Kapil , A. (1993): Piperine : A potent Inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro , Planta Med. 59 , 474.
- 3-Philipson , J.D. and Wright , C.W. (1991): Antiprotozoa agents from plant sources , Planta Med. 57 , 553-559.
- 4- Sahpas , S. ; Boris , Ch. ; Loiseau , P.M. ; Cortes , D. ; Hocquemiller , R. ; Laurens , A. and Cave , A. (1994): Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona Senegalensis* seeds , Planta Med. 60 , 538-540.