Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Effect of thyme plants on *Leishmania amastigotes* in invitro: compared with Amphotericin B

Ali Bagherain[1*], Seyed Hossein Hejazi[2], Motahareh Mirzaei[3], Hamed Mirzaei[4], Hamid Reza Mirzaei[5], Mohammad Jaber Masoud Khoy[6]

[1]Department of Biology, School of Agriculture, Islamic Azad University of Saveh, Saveh, Iran
[2]Department of Parasitology & Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3]Departemnt of Biology, School of Basic Sciences, University of Golestan, Gorgan, Iran
[4]Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5]Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[6]Department of Horticultural, School of Agriculture & Natural Resources, Islamic Azad University, Abhar Branch, Abhar, Iran
*Corresponding author; E-mail: a.bagherian63@gmail.com

Received: 26 June 2014 Accepted: 8 October 2014 First Published online: 10 April 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 June;39(2):6-13

Abstract

Background: Leishmaniasis consisted of a set of parasitic disease with a spectrum of clinical symptoms appear, including coetaneous Leishmaniasis, mucosal and visceral all symptoms. Recently, there has been considerable progress in the use of herbal medicines for the treatment of Leishmaniasis. The purpose of this study was to evaluate the effect of thyme essential oils of four plant species compared with Amphotericin B on Leishmania Amastigotes in invitro.

Methods: Leishmania (Leishmania major) strains were cultured with medium RPMI- 1640 containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics and transported at a temperature of 25 ± 2 ° C. The stationary phase of growth were studied in different concentrations of essential oils in comparison with the control drug, Amphotericin B on Leishmania Amastigotes by using colorimetric meth. The absorbance was measured (Optical density) by means of (ELISA reader) and was calculated as the IC 50. The mean absorbance of the groups studied showed no significant difference (P <0/001), the Duncan test showed significant differences between the concentrations of the test and control groups.

Results: The results showed that optical absorption and IC 50 species of thyme essential oils affect drug compared with controls.

Conclusions: Our results showed that the herb thyme is effective for the treatment of coetaneous Leishmaniasis. According to these results suggest that the efficacy was evaluated alone or in combination against human coetaneous Leishmaniasis as a randomized clinical trial.

Keywords: Leishmania, Macrophages, Essential oils of thyme, MTT.

How to cite this article: Bagherain A, Hejazi S H, Mirzaei M, Mirzaei H, Mirzaei H R, Masoud Khoy M J. [Effect of thyme plants on *Leishmania amastigotes* in invitro: compared with Amphotericin B]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 June; 39(2):6-13. Persian.

© 2017 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تاثیر گیاه آویشن در مقایسه با آمفوتریسین B بر آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط invitro

علی باقریان[۱*]، سید حسین حجازی[۲]، مطهره میرزایی[۳]، حامد میرزایی[۴]، حمید رضا میرزایی[۵]، محمد جابر مسعودی خویی[۶]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران
[۲]گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳]گروه زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران
[۴]گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۵]گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۶]گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، ابهر، ایران
*نویسنده رابط؛ ایمیل: a.bagherian63@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۳/۴/۵ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۶ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۱/۲۱
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶ خرداد و تیر؛ ۳۹(۲): ۶-۱۳

چکیده

زمینه: لیشمانیازیس ها مجموعه ای از بیماری های انگلی را شامل می شوند که به صورت طیف وسیعی از علایم بالینی شامل لیشمانیازیس پوستی، پوستی -مخاطی و احشاییرخ می دهند. اخیرا پیشرفتهای زیادی در زمینه استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان لیشمانیازیس حاصل شده است. هدف از این تحقیق، تاثیر اسانس چهار گونه گیاه آویشن در مقایسه با آمفوتریسین B بر آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط invitro می باشد.

روش کار: لیشمانیا ماژور(*Leishmania major*) سویه استاندارد به محیط کشت RPMI- 1640 حاوی ۱۰ % سرم جنین گاوی(FCS) و آنتی بیوتیک متقل و در دمای $25\pm2^{\circ}$ C کشت داده شد. سپس در مرحله ثابت رشد تاثیر غلظت های مختلف اسانس های گیاهی در مقایسه با داروی کنترل آمفوتریسین B بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور با استفاده از روش رنگ سنجیMTT مورد بررسی قرار گرفت. میزان جذب نوری (Optical density) بوسیله دستگاه ELISA reader سنجیده شد و مقدار IC 50 محاسبه گردید. به طور کلی میانگین جذب نوری در گروه های مورد بررسی اختلاف معنی داری (P<۰/۰۰۱) نشان داد. در آزمون مقایسه میانگین دانکن اختلاف معنی داری بین غلظت های مورد آزمایش و گروه کنترل دیده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از جذب نوری و IC 50 نشان داد که اسانس های چهار گونه آویشن در مقایسه با داروی کنترل دارای تاثیر می باشد.

بحث و نتیجه گیری: گیاه آویشن، برای درمان لیشمانیازیس پوستی موثر است. اثر بخشی این ترکیبات به تنهایی یا در ترکیب در برابر لیشمانیازیس جلدی انسان به عنوان یک کارآزمایی بالینی تصادفی ارزیابی شده است.

کلیدواژه ها: لیشمانیا ماژور، ماکروفاژ، اسانس های گیاهی آویشن، روشMTT.

نحوه استناد به این مقاله: باقریان ع، حجازی سح، میرزایی م، میرزایی ح، میرزایی حر، مسعودی خویی مج. تاثیر گیاه آویشن در مقایسه با آمفوتریسین B بر آماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط invitro. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۲): ۶-۱۳

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

سازمان جهانی بهداشت، بیماری لیشمانیازیس (*Leishmaniasis*) را در ردیف شش بیماری مهم انگلی مناطق گرمسیری دنیا معرفی کرده است. در حال حاضر ۹۸ کشور جهان به انواع مختلف این بیماری آلوده می باشند و تعداد موارد جدید بیماری سالیانه دو میلیون نفر تخمین زده می شود که از این تعداد ۱/۵ میلیون مورد لیشمانیازیس جلدی و ۵۰۰ هزار لیشمانیازیس احشایی است.۹۰٪ لیشمانیازیس جلدی جهان از کشورهای افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه گزارش شده است (۱–۴). متأسفانه تعداد مبتلایان به انواع این بیماری در جهان رو به افزایش است. اشکال قابل مشاهده انگل به دو فرم پروماستیگوت و آماستیگوت می باشد. فرم تاژکدار یا پروماستیگوت انگل لیشمانیا که عامل بیماری لیشمانیازیس می باشد از طریق گزش پشه خاکی آلوده به میزبان مهره دار از جمله انسان منتقل شده و در داخل سلول های بیگانه خوار تک هسته به فرم غیر متحرک و بدون تاژک آماستیگوت تبدیل می گردد. در ایران لیشمانیازیس جلدی (خشک و مرطوب) از بیماری های مهم انگلی بوده و می توان گفت بعد از مالاریا مهمترین بیماری منتقله توسط بندپایان است. درمان دارویی لیشمانیازیس عمدتا شامل ترکیبات آنتی موان می باشد که در طی 65 سال گذشته صورت گرفته است (۵). دارو های خط اول در درمان این بیماری ها شامل آمفوتریسین B، مگلومین آنتیمونات (گلوکانتیم) و سدیم گلوکونات (پنتوستام) می باشد (۵–۷). این ترکیبات با اثر بر روی آنزیم انگلی به خصوص وقفه در آنزیم فسفوکیناز باعث جلوگیری از تولید آدنوزین تری فسفات می شود. از طرفی درمان لیشمانیازیس در کشورهای آندمیک بسیار هزینه بر است و استفاده نادرست از این ترکیبات باعث افزایش موارد مقاومت دارویی و بروز موارد عفونت شده است (۶, ۸). اغلب داروهایی که برای درمان لیشمانیازیس استفاده می شوند، دارای یک یا چند محدودیت می باشند، از جمله اینکه مقرون به صرفه نیستند، از نظر نحوه مصرف و همچنین سمیت دارای مشکلاتی می باشند و مهمترین مسئله در مورد این داروها گسترش مقاومت انگل به این داروها می باشد. در حال حاضر افزایش مقاومت در برابر ترکیبات آنتی موان به عنوان یک هشدار و چالش عمده در موفقیت درمانی مطرح است (۹–۱۱). از این رو نیاز به گسترش ترکیبات ضد لیشمانیایی موثر، کم هزینه، با سمیت کم و همچنین با قابلیت تجویز از راه خوراکی، نسبت به گذشته، بیشتر احساس می شود (۱۲). با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هر گونه عارضه هستند و از طرفی در دسترس و ارزان می باشند، این موضوع ضرورت استفاده از گیاهان بومی را بدین منظور مورد تاکید قرار می دهد (۱۳). این تحقیق با هدف تعیین اثر ضد لیشمانیایی چهار اسانس گونه آویشن استخراج شده، بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. روش رنگ سنجی MTT که یک روش کمی اسپکتروفتومتری است، جهت تعیین زنده بودن سلول-ها به کار می رود و اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط Mosmann معرفی شد (۱۴, ۱۵). این روش، یک روش رنگ سنجی است که طی آن نمک تترازولیوم diphenyl (Tetrazolium salt) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5- Tetrazolium bromide]MTT به یک محصول رنگی فورمازاننامحلول تبدیل می شود (۱۴–۱۹). این واکنش احیاء توسط فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل صورت می گیرد. که به عنوان یک مولفه رشد و زنده بودن پروماستیگوت ها در برابر پاسخ داروئی به کار می رود.

روش کار

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۴ گونه گیاه آویشن *Thymus pubesense*، *Thymus caucasicus*، *Thymus vulgaris*، *Thymus kotschyanus* *می باشد* که از هرباریوم موسسه جنگل ها و مراتع تهیه و در سایه و به دور از نور مستقیم آفتاب خشک نگه داری شدند. نمونه های فیتوشیمی خشک شده در آسیاب تمیز و عاری از هر گونه آلودگی به سایر نمونه های گیاهی به صورت پودر در آورده شد. در استخراج روغن های اسانسی به روش تقطیر با آب از دستگاه کلونجر استفاده شد. برای این کار ۱۰۰ گرم از هرگیاه را به صورت جداگانه که در آسیاب خرد شده را در یک بالن ۲ لیتری ریخته و حدود ۱ لیتر آب به آن اضافه نمودیم. سپس دستگاه را سوار کرده و عمل تقطیر را به مدت ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه ادامه دادیم تا اینکه حجم اسانس استخراج شده ثابت باقی بماند. اسانس به رنگ سفید بر روی فاز آبی جمع آوری گردید. پس از اتمام اسانس گیری و خنک شدن دستگاه با باز کردن شیر مبرد دستگاه کلونجر، ابتدا آب و سپس اسانس استخراج شد. اسانس توسط سدیم سولفات خشک آبگیری شد. اسانس در شیشه مخصوص اسانس با رنگ تیره نگه داری شد. برای افزایش دقت کار استخراج اسانس ها در سه تکرار انجام گردید. سلول‌های ماکروفاژ استفاده شده در این مطالعه از نوع ماکروفاژهای انسانی THP-1 بودند که از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شده بودند. این سلولها در فلاسکهای کشت سلولی T-75 نگهداری و تکثیر داده می شدند. محیط مورد استفاده برای نگهداری و تکثیر این سلولها RPMI1640 که با سرم

جنینی گاوی (FBS) ده درصد غنی شده بودند. کشت های سلولی بعد از رسیدن به CONFLUENCY هفتاد درصد پاساژ داده می شدند. سلولهای رده ی THP-1 تقریبا کند رشد بودند و بعد از سه روز از پاساژ قابل برداشت و آماده آلوده شدن با لیشمانیا بودند. ضمنا فلاسک های کشت سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد Co2 نگه داری می شدند. از داروی آمفوتریسین B به عنوان کنترل استفاده گردید. این دارو که به صورت پودر بود از شرکت SIGMA امریکا تهیه گردید. انگل ها از نوع لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) بودند که از بانک سلولی گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شده بودند. این انگل ها در فالکون های استریل حاوی محیط کشت NNN و RPMI1640 غنی شده با سرم جنینی گاوی (FBS) ده درصددر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری و تکثیر داده شدند. انگل ها بطور روزانه از لحاظ نیاز به محیط کشت تازه و Viability بررسی می شدند بطوریکه این سلولها هر دو روز نیاز به نیم سی سی محیط کشت RPMI1640 غنی شده با FBS داشتند. برای آلوده کردن ماکروفاژها به انگل در ابتدا ۳×۱۰^{۶} در میلی لیتر سلول ماکروفاژی به فلاسک کشت سلولی انتقال و تعداد ۱۵×۱۰^{۶} در میلی لیتر انگل لیشمانیا ماژور به فلاسک سلولی حاوی ماکروفاژها انتقال داده شد. (نسبت تعداد ماکروفاژها به لیشمانیا ۱ به ۵ بود). فلاسک حاوی ماکروفاژهای آلوده به مدت ۲۴ ساعت در انکوبه شد. تا انگل ها وارد ماکروفاژها شوند. سپس به وسیله cell scraper ماکروفاژها از سطح فلاسک جدا شدند.

از آماستیگوتهای لیشمانیا ماژور موجود در محیط کشت که در فاز ثابت رشد(Stationary phase) هستند به میزان 100 µl برداشته و به هر چاهک پلیت 96 خانه ای به صورت Triplicate اضافه کردیم یعنی در هر چاهک ۱×۱۰^{۵} آماستیگوت قرار گرفت. در ادامه از اسانس های مختلف و داروی کنترل که به ترتیب در غلظت های ۵۰،۲۵۰،۲۰۰،۱۵۰،۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. و به میزان µl ۱۰ به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای به صورت Triplicate، اضافه گردید. علاوه بر این از شاهد (بلانک) نیز استفاده شد، بدین صورت که در یک چاهک پلیت فقط سلول و محیط کشت و در یک چاهک سلول و DMSO5% و در چاهک دیگر محیط کشت بدون سلول یا دارو به میزان µl ۱۰۰ اضافه گردید (به صورت Triplicate). و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، پلیتها را خارج کردیم و به میزان % 10 حجم هر چاهک از محلول ذخیره MTT ۵ (میلی گرم بر میلی لیتر) که قبلا تهیه شده بود به داخل هر چاهک ریخته شد. چاهک کنترل منفی حاوی µl ۱۰۰ محیط کشت و فقط حاوی µl ۱۰ از محلول MTT بود. برای تهیه محلول MTT ، ۵ میلی گرم از پودر MTT را در ۱ میلی لیتر محلول PBS استریل (5 mg/ml) حل کردیم.

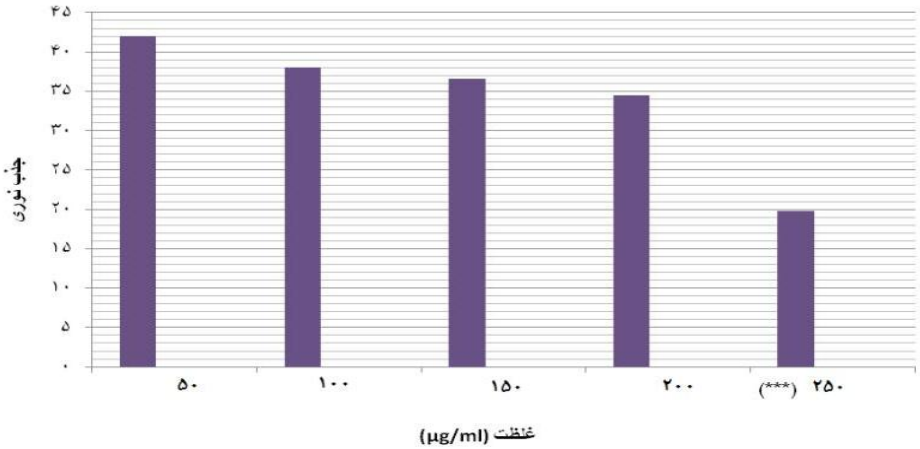
در این بررسی از آزمون آماری ANOVA برای مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه ها و در صورت معنی دار بودن از آزمون مقایسه میانگین دانکن برای تعیین اثر بخشی داروی کنترل و اسانس ها استفاده شد. علاوه بر این سطح معنی داری P< ۰/۰۱ و فاصله اطمینان ۹۹٪ در نظر گرفته شد (نمودار ۱).

یافته ها

در این بررسی که در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد، از بین غلظتهای مختلف چهار اسانس گونه آویشن و داروی کنترل (آمفوتریسین B)، اثر ضد لیشمانیایی آنها تعیین شد که از نظر آماری بین تاثیر غلظتهای مختلف (۵۰µg/ml -250) اختلاف معنی داری (P<۰/۰۰۱) مشاهده شد و این اختلاف در آزمون مقایسه میانگین دانکن مربوط به اختلاف در غلظت (۲۵۰µg/ml) با سایر غلظت ها می باشد که نشان دهنده آن است که این دارو رشد آماستیگوتهای لیشمانیا ماژور را مهار می کند. با توجه به این که اثر غلظت (۲۵۰µgl/ml) داروی کنترل بر روی آماستیگوتها نسبت به غلظتهای دیگردارای تاثیر بهتری بود، جهت تعیین اثر ضد لیشمانیایی، همین غلظت با غلظت های اسانس های مختلف چهار گونه آویشن، مقایسه گردید(نمودار ۲).

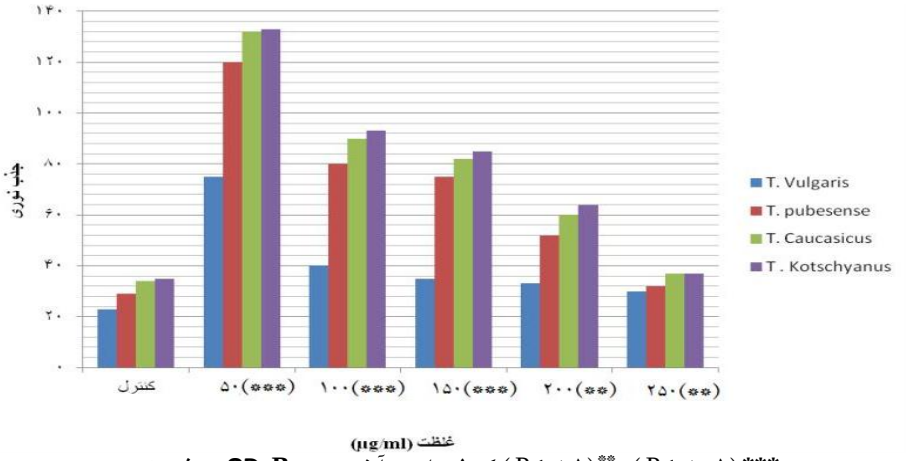
تاثیر غلظت های مختلف اسانس *T. pubesense* ، *T. caucasicus*، *T. vulgaris*، *T. kotschyanus* برآماستیگوتهای لیشمانیا ماژور:

به طور کلی میانگین جذب نوری در گروه های مورد بررسی اختلاف معنی داری (P<۰/۰۰۱) نشان داد که در غلظت-های ۵۰،۱۰۰،۲۰۰،۱۵۰ به طور معنی داری (P<۰/۰۰۱) میانگین جذب نوری بالاتر بود و در آزمون مقایسه میانگین دانکن اختلاف معنی داری بین غلظت های فوق و گروه کنترل دیده شد (نمودار ۳).



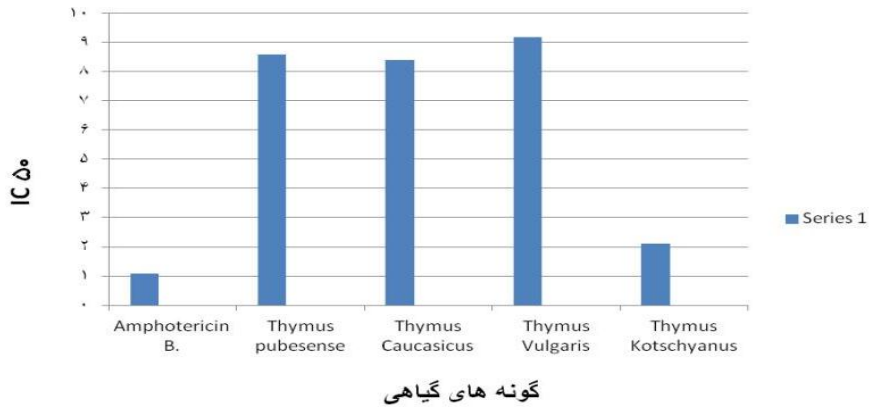
***تفاوت معنی داری بین غلظت ۲۵۰ µg/ml با سایر غلظت ها مشاهده شد (P<۰/۰۰۱)

نمودار ۱: مقایسه میانگین جذب نوری غلظت های مختلف داروی کنترل در سه زمان ۲۴ ،۴۸و ۷۲ ساعت بر روی آماستیگوت های ***L.major***



*** (P<۰/۰۰۱) و** (P<۰/۰۱) کنترل: داروی آمفوتریسین **B OD** : جذب نوری

نمودار۲: مقایسه میانگین جذب نوری اسانس های *T.vulgaris*, *T.pubesense*, *T.caucasicus*, *T. kotschyanus* و داروی کنترل بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور



نمودار۳: مقایسه میزان **IC ۵۰** گونه‌های گیاهی با داروی کنترل

بحث

لیشمانیازیس به عنوان یک مشکل بهداشتی در اکثر کشورهای جهان به ویژه در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ایران، محسوب می شود. این بیماری در سراسر جهان انتشار دارد و ۹۰٪ موارد آن در ۷ کشور جهان شامل افغانستان، الجزایر، ایران، برزیل، پرو، سوریه و عربستان سعودی وجود دارد (۳, ۴, ۲۰).

در ایران در زمینه‌ی اثرات ضد تک یاخته‌ای گیاهان دارویی، تحقیقات وسیعی انجام شده است که از جمله آنها، بررسی گیاه آویشن بر روی سالک می باشد. و از طرفی اثرات ضد لیشمانیایی برخی از گیاهان دارویی نیز بر روی پروماستیگوت های انگل، بررسی شده است (۲۰-۲۴). آزمایش هایی که در حال حاضر برای بررسی دارو ها و ترکیبات ضد لیشمانیایی به کار برده می شوند، دارای محدودیت های فراوانی می باشند، از جمله این که، خطر ناک هستند، نیاز به پیش سازه های رادیو اکتیو از قبیل H۳- تیمیدین دارند و بسیار پر زحمت و وقت گیر می باشند (۲۰, ۲۵). برای تعیین زنده بودن (viability) آمستیگوت های لیشمانیا تا کنون چندین روش ابداع و معرفی شده است که شامل شمارش سلول های زنده، اندازه گیری فعالیت انزیمی و واکنش احیای نمک ترازولیوم می شود (۲۵). در مطالعاتی که در زمینه تاثیر ضد لیشمانیایی داروها و اسانس‌های گیاهی در ایران و کشورهای دیگر انجام شده، اغلب از روش شمارش مستقیم به وسیله لام نئوبار استفاده شده، که یک روش وقت‌گیر و غیردقیق می‌باشد (۲۵, ۲۶). روش رنگ سنجی (Colorimetry) که برای بررسی رشد و زنده بودن سلول‌ها بر روی پلیت های میکرو تیتر انجام می‌شوند، فواید زیادی دارند از جمله اینکه این روش ها، علاوه بر سهولت انجام و ارزانی، سریع حساس و قابل اعتماد می باشند و همچنین فاقد هر گونه ماده رادیوایزوتوپ هستند و از این رو ایمن و مطمئن هستند. از طرفی این روش ها دارای قابلیت تکرار پذیری می باشند واز این رو امکان غربال گری داروها را با سهولت فراهم می کنند (۲۶). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس ها و داروی آمفوتریسین B، اثر مهاری بر روی آماستیگوتهای لیشمانیا ماژور افزایش می یابد و کاهش جذب نوری (OD) نشان دهنده این اثر مهاری می باشد. دلیل افزایش جذب نوری نیز مربوط به رنگ فورمازانی است که بوسیله فعالیت متابولیکی آنزیم میتوکندریایی دهیدروژناز در سلول های فعال و زنده تولید می شود که با تعداد سلول های زنده در ارتباط است. در مطالعه حاضر مقایسه میانگین جذب نوری اسانس های مورد بررسی و داروی کنترل، دارای اختلاف معنی داری بود که این نشان می دهد همه اسانس‌ها به نسبتهای مختلفی باعث کاهش رشد انگل لیشمانیا ماژور شدند. علاوه بر این با مقایسه میانگین جذب نوری غلظت های مختلف اسانس ها و کنترل میزان تاثیر هر کدام نشان داده شده است، به طوری که اگر اسانس مورد نظر در غلظت خاصی دارای میانگین جذب نوری بالاتر باشد، نشان دهنده تاثیر کمتر آن است و در صورتیکه میانگین جذب نوری آن کمتر باشد بیانگر تاثیر بهتر اسانس‌ها می‌باشد. علاوه بر این همانطور که اشاره شد، غلظت ۲۵۰µg/ml داروی کنترل که بهترین پایش را در مهار رشد انگل لیشمانیا ماژور از خود به عبارت دیگر انتخاب رقتهای پایین‌تر داروی کنترل و مقایسه آن با هر کدام از غلظت های عصاره ها این تاثیر را به صورت مضاعف نشان خواهد داد و جذب نوری هر کدام از غلظت‌های اسانس ها مشابه با کنترل، به معنی تاثیر مطلوب آن اسانس، تلقی می شود.

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان داد که اسانس های *T. pubesense*، *T. caucasicus*، *T. kotschyanus* که در این مطالعه دارای کمترین تاثیر می باشند و در غلظت های ۵۰µg/ml، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ بی تاثیر می باشند و تنها در غلظت ۲۵۰µg/ml داروی کنترل هم خوانی دارند. از طرفی اسانس *T. vulgaris* که بهترین اثر را از خود نشان داد. فقط در غلظت ۵۰ µg/ml بی تأثیر بود و در غلظت های دیگر با داروی کنترل هم خوانی داشت. با توجه به اینکه اسانس‌های گیاهی *T. pubesense*، *T. caucasicus*، *T. vulgaris*، *T. kotschyanus* بر روی آماستسگوتهای لیشمانیا ماژور اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی نشان داده‌اند، ضرورت انجام آزمایشات بیشتری جهت ارزیابی این اسانس ها بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی و انسان های داوطلب، احساس می شود.

References

1. Organization WH. WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. 2000.
2. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2001; **95**(3): 239-243. doi: 10.1016/S0035-9203(01)90223-8

3. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2004; **27**(5): 305-318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004
4. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one* 2012; **7**(5): e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
5. John DT, Petri WA, Markell EK, Voge M. *Markell and Voge's medical parasitology*. Elsevier Health Sciences, 2006.
6. Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, Ponte-Sucre A. < i> Leishmania</i> spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; **29**(6): 637-642. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.01.004
7. Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *New England Journal of Medicine* 2010; **362**(6): 504-512.
8. Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, Ponte-Sucre A. Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; **29**(6): 637-642. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.01.004
9. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design* 2002; **8**(4): 319-342.
10. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research* 2006; **123**(3): 399.
11. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* 2005; **66**(17): 2056-2071. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.01.011
12. Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 2009; **80**(2): 81-90. doi: 10.1016/j.fitote.2008.10.009
13. Lamidi M, DiGiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C, Rondi M, et al. In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. *Journal of ethnopharmacology* 2005; **102**(2): 185-190. doi: 10.1016/j.jep.2005.06.011
14. Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen T. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function ofLeishmania major promastigotes. *Parasitology Research* 1994; **80**(3): 235-239.
15. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 1986; **89**(2): 271-277. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6
16. 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): 119-122. doi: 10.1016/j.parint.2005.01.001
17. Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against< i> Leishmania</i> using the dye Alamar Blue®. *Parasitology International* 2000; **48**(3): 265-269. doi: 10.1016/S1383-5769(99)00020-3
18. Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. *Research in Microbiology* 2004; **155**(4): 224-230.
19. Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barria E, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. *Journal of Microbiological Methods* 2003; **55**(3): 813-816. doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.013
20. Estevez Y, Castillo D, Pisango MT, Arevalo J, Rojas R, Alban J, et al. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; **114**(2): 254-259.
21. Seidi Z. The evaluation of herbal medicine efficacy on cutaneous Leishmaniasis. *Reviews in Clinical Medicine* 2014; **1**(3): 30-35.
22. Sanchez-Suarez J, Riveros I, Delgado G. Evaluation of the leishmanicidal and cytotoxic potential of essential oils derived from ten colombian plants. *Iranian Journal of Parasitology* 2013; **8**(1): 129.
23. Hooshyar H, Talari S, Feyzi F. Therapeutic Effect of Hedera helix Alcoholic Extract Against Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania major in Balb/c Mice. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014; **7**(4): e9432.

24. Monzote L, Alarcón O, Setzer WN. Antiprotozoal activity of essential oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)* 2012; **77**(4): 167-175.
25. Azadbakht M, Ziai H, Shaaban Kb. Effect of Essential Oils of Artemisia Aucheri Boiss. Zataria Multiflora Boiss and Myrtus Communis L. On Trichomonas Vaginalis. *Journal of Medicinal Plants* 2003.
26. Nahrevanian H, Najafzadeh M, Hajihosseini R, Nazem H, Farahmand M, Zamani Z. Anti-leishmanial effects of trinitroglycerin in BALB/C mice infected with Leishmania major via nitric oxide pathway. *The Korean Journal of Parasitology* 2009; **47**(2): 109-115.