بررسی اثر آلکالوئیدهای اختصاصی گیاه وینکا ماژور (گیاه پروانش) بر لیشمانیا ماژور در شرایط In vitro , In vivo

دکتر مهدی آسمار[۱] ، مهین فرهمند[۱]، زهره عقیقی[۱] ، دکتر ناصر قائمی[۲] ، دکتر عبدالمجید آیت الهی[۳]

چکیده :

سازمان جهانی بهداشت لیشمانیوز را به عنوان یک مشکل بهداشتی در سطح جهان معرفی کرده است. این بیماری در ایران شیوع فراوانی داشته و در سالهای اخیر به دلیل افزایش جمعیت و فاکتور های شناخته و نا شناخته بسیار ، میزان بروز سالانه لیشمانیوز جلدی افزایش یافته است و نواحی جدید مورد تهاجم انگل واقع شده اند . چون واکسن مؤثری وجود ندارد هنوز احتیاج به داروهای مناسب جهت درمان می باشد . داروهای رایج برای درمان بیشتر انواع لیشمانیوز ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموآن ، گلوکانتیم و پنتوستام بوده که در ۲۵-۱۰٪ موارد در تمام فرمهای لیشمانیوز عود بیماری و عدم موفقیت مشاهده می شود . درمان با این داروها کاملا" مؤثر نبوده و همگی دارای عوارض جانبی شدید از جمله اثرات سمی بر روی قلب، کلیه ها و غیره می باشند . با توجه به این که گیاه وینکا ماژور اهمیت درمانی دارد، در تحقیق حاضر اثر بخشی آلکالوئیدهای جدا شده از گیاه وینکا ماژور در محیط کشت و در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت .

نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره تخلیص شده گیاه وینکا در غلظتهای مختلف باعث کاهش قابل توجهی در تعداد پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور می شود .همچنین استفاده از این عصاره تخلیص شده در فاز کلروفرمی به صورت تزریقی در جلوگیری از پیشرفت زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موشهای Balb/c در مقایسه با شاهد تیمار نشده بسیار مؤثر بوده به طوری که از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار ($p< ۰/۰۰۵$) می باشد.

واژگان کلیدی : *لیشمانیا ماژور ، آلکالوئیدهای وینکا ماژور، اثرات درمانی ، Balb/c*

[۱] انستیتو پاستور ایران بخش انگل شناسی

[۲] دانشکده علوم دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۳] دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]

مقدمه :

لیشمانیوز بیماری پروتوزوآئی است که در انسان به اشکال مختلف جلدی، جلدی مخاطی و احشایی بروز می نماید. بیش از ۱۲ میلیون نفر در ۸۸ کشور جهان متأثر از این بیماری هستند و تخمین زده می شود که ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر آلودگی به انواع لیشمانیا می باشند و میزان بروز سالانه لیشمانیوز بالغ بر ۱/۵ میلیون نفرمی باشد (Plock A. et al 2001) .

لیشمانیوز جلدی (سالک) درایران از بیماریهای بومی است و میزان بروز آن در بین دانش آموزان شهرستان اردستان ۳/۲ در هزار گزارش شده است (Yagoobi E. et al 2001).

داروهای رایج برای درمان انواع لیشمانیوز ترکیبات آنتی موان ۵ ظرفیتی ، گلوکانتیم و پنتوستام بوده که در ۲۵ – ۱۰٪ موارد در تمام فرمهای لیشمانیوز عود بیماری و عدم موفقیت مشاهده می شود. اگر این داروها تأثیر نکنند از پنتا میدین و آمفوتریسین B استفاده می شود . درمان با این داروها به طور کامل مؤثر نبوده و همگی دارای عوارض جانبی شدید از جمله اثرات سمی بر روی قلب وکلیه ها می باشد و همچنین می توان آنمی ، افزایش ترانس آمینازها ، استفراغ و غیره را نیز به این عوارض اضافه نمود. (محبعلی ، مهدی . ۱۳۷٤ و Saldanha A.C. 2000) .

با توجه به موارد ذکر شده بالا و عوارض ناشی از داروهای شیمیایی، گیاهان به عنوان منابع طبیعی و ارزشمند دارویی مورد تحقیق و بررسی می باشند و با توجه به تحقیقات انجام شده در زمینه تأثیر عصاره های گیاهی بر روی گونه های مختلف لیشمانیا (Plock A. et al 2001) موجب گردید که ما در این پژوهش ، اثر بخشی آلکالوئیدهای اختصاصی گیاه وینکا را بر لیشمانیا ماژور مورد بررسی قرار دهیم .

روش کار :

۱.جمع آوری گیاه مورد مطالعه و استخراج عصاره گیاه :

گیاه وینکا ماژور(پروانش)که یکی از انواع گیاهان زینتی بوده و به نام پیچ تلگرافی معروف است متعلق به گیاهان تیره خرزهره می باشد که از پارکهای تهران بزرگ جمع آوری و پس از شناسایی در شرایط مطلوب برگ و ساقه آن خشک و با استفاده از متانول ۸۰٪ و دستگاه سوکسیله مورد عصاره گیری قرار گرفت و متانول آن به کمک دستگاه تقطیر در خلاء دوار تبخیر گردید (این عمل تا حدی انجام می شود که متانول آن تقطیر شده و آب باقی بماند) عصاره حاصل جهت جدا نمودن آلکا لوئیدهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت (صمصام، شریعت. ۱۳۷۱ و نوروزی ، م. ۹ – ۱۳٦۸).

۲.روش استخراج آلکالوئیدها از گیاه کامل

جدا سازی آلکالوئیدها با روش زیر انجام گرفت :

الف ـ به علت خاصیت قلیایی، آلکالو ئیدها را می توان با استفاده از اسیدهای رقیق (اسید کلریدریک یک ملکول در لیتر) استخراج و با قلیایی کردن به وسیله آمونیاک غلیظ، آنها را رسوب داد و با استفاده از معرفهای آلکالوئیدی آنها را مورد آزمایش قرار داد . برای این منظور ابتدا pH عصاره متانولی را با اضافه کردن اسیدکلریدریک به حدود pH= ۳ رساندیم و با آمونیاک غلیظ مجدداً pH را به ۸ تغییر دادیم و با استفاده از کلروفرم در دکانتور آبی، فاز کلروفرمی و فاز آبی و رسوب باقیمانده را جدا نمودیم (پیوندی ، م. ۱۳۷۱).

ب – در این روش از ستون کروماتوگرافی (سیلیکاژل) استفاده کرده و با محلول دی کلرومتان حاوی(۱۵٪ متانول و ۸۵٪ دی کلرومتان) ستون راشستشو دادیم و فراکسیون های مختلف را در حجمهای ۱۰ ml جمع آوری نمودیم. از فراکسیون های فوق به روش thin layer chromatography (TLC) به وسیله سیستم حلال کلروفرم ـ متانول(۵٪ متانول – ۹۵٪ کلروفرم) کروماتوگرافی به عمل آورده و نمونه های مورد نظر را جمع آوری و سپس تبخیر نمودیم.

۳.کشت انگل در محیط RPMI 1640 جهت بررسی تأثیر غلظتهای مختلف عصاره بر پروماستیگوتهای *لیشمانیا ماژور* :

از انگل *لیشمانیا ماژور* به مشخصات MRHO/SU/59/P-Strain که در روی محیط N.N.N

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]

نگهداری می شود به عنوان یک سوش استاندارد استفاده شد، این سوش از بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه گردیده است . پروماستیگوتهای *لیشمانیا ماژور* در مرحله ایستای رشد همراه محیط RPMI 1640 غنی شده با سرم جنین گاوی ۱۰٪ در پلیت های کشت سلولی کشت داده شد به نحوی که تعداد پروماستیگوتها در هر میلی لیتر از محیط $۱/٤\times۱۰^{٥}$ تعیین گردیدند؛ سپس از عصاره کلروفرمی رقتهای ۱۵۰، ۳۰۰، ٤٥٠، ٦۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم ماده خشک در هر میلی لیتر با DMSO ۱٪در PBS تهیه و سترون شد و تأثیر آن بر پروماستیگوتهای انگل در زمانهای مختلف ۲٤ ، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت مورد بررسی قرار گرفت .

٤. آماده سازی حیوان آزمایشگاهی حساس جهت تیمارهای مختلف :

جهت بررسی اثر آلکالوئیدهای گیاه *وینکا* در مدل حیوانی از موش آزمایشگاهی Balb/C که از نظر سنی ٦ الی ۸ هفته ای بودند، به تعداد ٦۰ سر استفاده شد.

برای آلوده کردن موشها به انگل لیشمانیا ماژور از فرم پروماستیگوت لیشمانیا در فاز ایستای رشد استفاده گردید . برای این منظور ۲ الی ۳ روز متوالی انگلهای کشت داده شده در محیط RPMI شمارش شدند و با حصول اطمینان از فاز ایستا به میزان ۳×۱۰^{٦} انگل در هر میلی مترمکعب به صورت زیر جلدی در محل انتهای دم حیوان تزریق گردید .

پس از ۲۵ الی ۳۰ روز در محل تزریق انگل زنده، برجستگی ندولی ایجاد شد و پس از حدود یک هفته این برجستگی تبدیل به زخم شد که در روش میکروسکوپی وجود اجسام لیشمن در زخم مورد تأیید قرار گرفت . موشهای دارای زخم به ۵ گروه ۱۲ تایی شامل گروه تحت تیمار موضعی ، گروه تیمار درمان تزریقی و سه گروه شاهد تقسیم گردید و برای تفکیک موشها از یکدیگر از علامت گذاری توسط بریدن لاله گوش استفاده شد .

۵. روش بررسی موشهای تیمار شده :

دراین روش برای تعیین اثربخشی عصاره گیاه وینکا بر روی زخم موشهای تحت بررسی ، فقط از روش اندازه گیری قطر زخم با کولیس استفاده شده است.

٦. روش تیمار زخم موشها :

درمان موشهای آلوده را به دو طریق ، تیمار موضعی به روش استفاده از پماد حاوی ۲۰٪ ماده مؤثره گیاه وینکا و تیمار تزریقی به روش تزریق ماده موثره گیاه وینکا در حاشیه زخم به شرح زیر انجام گرفت .

الف) تیمار موضعی (تهیه پماد) :

برای تهیه پماد از پایه پماد اوسرین استفاده شد زیرا این پایه پماد می تواند مواد چربی و آلی را، هم در خود حل کرده و هم آزاد نماید. پماد تهیه شده به مدت ٤۵ روز، روزانه یک بار برای موشها مورد استفاده قرار گرفت .

ب) تیمار تزریقی :

در این روش میزان تزریق بر اساس میلی گرم وزن خشک ماده مؤثره در کیلوگرم وزن بدن (mg/kg) گردیدو در ۲۰ تزریق پیاپی مورد استفاده قرار گرفت و هفته ای دوبار قطر زخمها مورد اندازه گیری قرار گرفتند. در این بررسی یک گروه به عنوان گروه شاهد یعنی گروهی که هیچ ماده ای دریافت نکردند و یک گروه که فقط ماده حلال را دریافت کردند در نظر گرفته شد.

نتایج :

در بررسی عصاره توتال گیاه *وینکا ماژور* برروی ستون حاوی سیلیکا ژل و لایه نازک با استفاده از سیستم حلال کلروفرمی وجود ۵ خانواده از ترکیبات آلی شامل کینولینها، پریدوکینولینها، ایزوکینولینها و گروههای هیدروکسی و متوکسی ثابت گردید که به عنوان ماده مؤثره بر لیشمانیا ماژور مورد استفاده قرار گرفت .

عصاره کلروفرمی مزبور در تمامی غلظتهای مورد نظر علیه پروماستیگوتهای لیشمانیا *ماژور* در محیطهای کشت با درجات مختلف مؤثر بوده است . اگر چه غلظت ۱۵۰

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]

میکروگرم در میلی لیتر، اثر ناچیزی بر پروماستیگوتها داشته است، اما غلظت ۷۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۹۶ ساعت موجب انهدام تمامی انگلها شد (نمودار شماره ۱).

در بررسی اثر بخشی، عصاره های تخلیص شده گیاه *وینکا ماژور* به صورت پماد و به صورت تزریقی و تعیین میانگین قطر زخمهای سالکی ایجاد شده در موشهای آزمایشگاهی تحت بررسی هفته ای دو بار با استفاده از کولیس بر اساس آزمون ANOVA نشان می دهد که بین میانگین قطر زخمهای اندازه گیری شده در گروههای تیمار شده با پماد تهیه شده از عصاره گیاه وینکا و گروههای شاهد اختلاف معنی داری از نظر آماری وجود ندارد(نمودار شماره ۲) و نتایج حاصل از آزمون ANOVA نشان می دهد که بین میانگین قطر زخمهای اندازه گیری شده در گروههای تیمار شده تزریقی و گروههای شاهد اختلاف معنی داری از نظر آماری ($p<$ ۰/۰۰۵) و اطمینان ۹۹/۵٪) وجود دارد (نمودار شماره ۳).

از آن جاکه محلول DMSO ماده سمی برای لیشمانیا ماژور تلقی می گردد، در این تجربه از غلظت ۱٪ آن در تامپون PBS استفاده شده است که در گروه شاهد بر تعداد پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور بی اثر بوده و در این پژوهش به عنوان ماده حلال مورد استفاده قرار گرفته است.

بحث :

در ارزیابی فعالیت ضد لیشمانیایی برروی پروماستیگوتهای *لیشمانیا ماژور* مشخص می شود که پروماستیگوتهای تیمار شده در بالا ترین غلظت بکار رفته در ۹۶ ساعت نسبت به شاهد ۱۰۰٪ کاهش و همچنین تخریب کامل پروماستیگوتها مشاهده می شود. در ارزیابی فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره تخلیص شده در فاز کلروفرمی (به صورت پماد ۲۰٪) در جلوگیری از پیشرفت زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موشهای Balb/C در مقایسه با شاهد تیمار شده با پایه پماد (اوسرین) و شاهد تیمار نشده (کنترل) چنین مشخص می شود که پماد مورد استفاده تاثیر کمی بر افزایش قطر زخم سالکی می گذارد که مطابق با یافته های Venerestrum و همکاران در سال ۱۹۹۰ می باشد.

در ارزیابی فعالیت ضد لیشمانیایی تزریق عصاره تخلیص شده در فاز کلروفرمی به صورت Intra lesional به میزان ۳۰ mg/Kg وزن بدن در جلوگیری از پیشرفت زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موشهای Balb/C در مقایسه با گروههای شاهد مشخص می شود که روش تزریق بسیار مناسب بوده به طوری که از نظر آماری ($p<$ ۰/۰۰۵) دارای اختلاف معنی داری می باشد.

بررسی مرگ و میر در این گروهها نشان داد که در گروههای شاهد بین هفته های دهم و دوازدهم پس از ایجاد عفونت، بیماری سیستمیک شده وتعداد قابل ملاحظه ای از موشها تلف گردیدند ولی در گروههای تیمار شده تزریقی هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نگردید که بیانگر اثر بخشی مطلوب عصاره گیاه وینکا ماژور در مهار بیماری است.

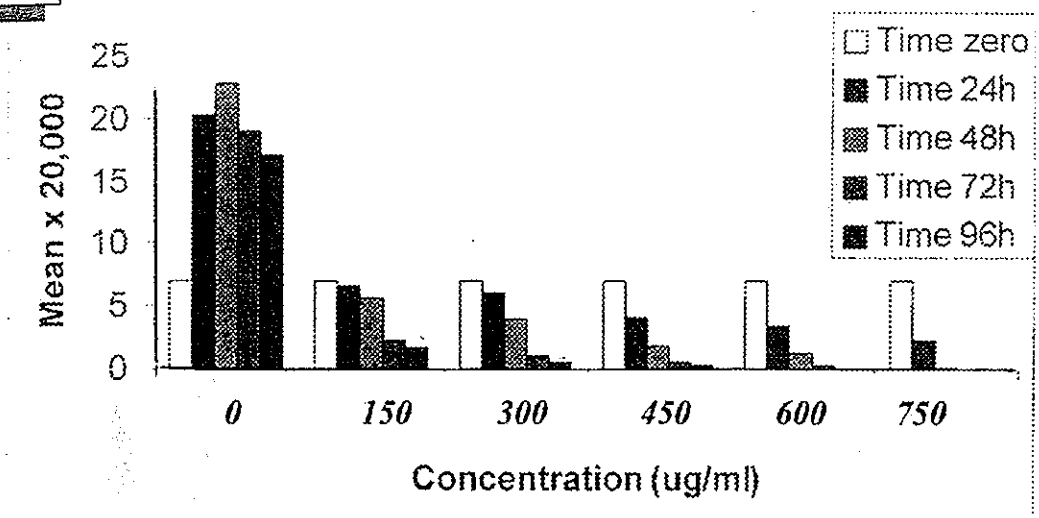
با توجه به نتایج حاصل در موشهای تیمار شده تزریقی بر مبنای میانگین قطر زخم درگروه شاهدقطر زخمهای آنها به میزان ۶۰٪ کاهش نشان می دهد و این نتیجه با یافته های Venerestrum و همکاران در سال ۱۹۹۰ که حدود ۵۰٪کاهش را دلیل بر اثر ضد لیشمانیایی معنی دار ذکر نموده اند مطابقت دارد.

با توجه به نتایج حاصله از این پژوهش و اثر بخشی آلکالوئیدهای اختصاصی گیاه *وینکا بر لیشمانیا ماژور* امید است بتوان با استفاده از آن در درمان بیماری سالک گامهای مؤثری برداشت.

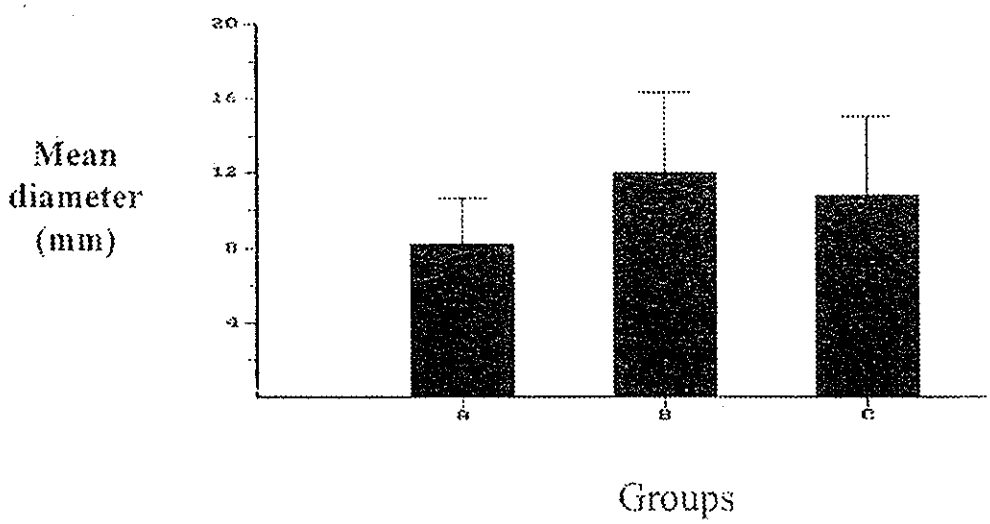
تقدیر و تشکر :

بدین وسیله از جناب آقای دکتر ملک افضلی معاونت محترم پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی که انجام این مطالعه را در قالب یک طرح تحقیقاتی و تأمین هزینه های آن، میسر ساخته اند و نیز از آقای مهندس محمد کمالی نژاد از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نموده اند تشکر می نماید.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]



نمودار ۱- میانگین تعداد پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور (۲۰۰۰۰ ×) در غلظتهای مختلف عصاره کلروفرومی برحسب زمان



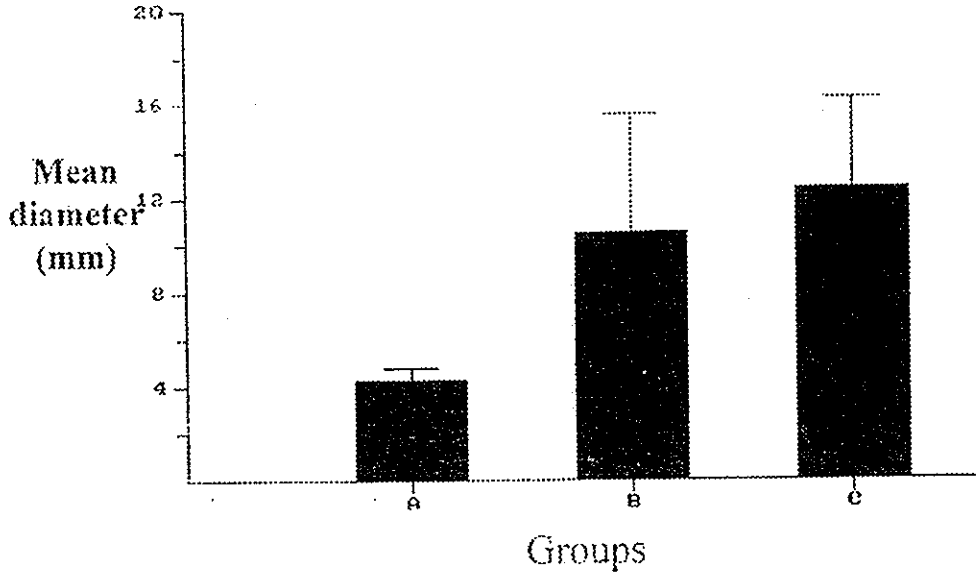
نمودار ۲- میانگین قطر زخم سالکی در گروههای تیمار شده با پماد ۲۰٪ به طور موضعی و گروههای شاهد

A. گروهی که به زخم آنها پماد حاوی عصاره کلروفرومی مالیده شد.

B. گروهی که به زخم آنها اوسرین خالص مالیده شد (گروه شاهد اوسرینی)

C. گروهی که هیچ ماده ای دریافت نکردند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]



نمودار ۳ – میانگین قطر زخم سالکی (میلی متر) در موشهای Balb/c تیمار شده با روش تزریق داخل زخمی و گروههای شاهد

A. گروهی که به آنها عصاره کلروفرمی تزریق شد.

B. گروهی که به زخم آنها سرم فیزیولوژی تزریق شد (گروه شاهد حلال)

C. گروهی که هیچ ماده ای به آنها تزریق نشد (گروه شاهد)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]

منابع:

پیوندی ، م. (۱۳۷۱). بررسی فیتوشیمی و اثرات ضد میکروبی گیاه خوشاروزه، پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد علوم گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران ـ دانشکده علوم ص ٦٨-٦٤.

صمصام شریعت، س. (۱۳۷۱). عصاره گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهی ، چاپ اول ، انتشارات مانی ، ص ٥٦-٥٣.

مجعلی، م. (۱۳۷٤). مروری بر روشهای نوین درمان لیشمانیوز جلدی در انسان، ماهنامه دارویی رازی شماره ۱۲ دی ماه سال ششم ص ۱۱.

نوروزی، م .(۹ – ۱۳٦۸) . بررسی فیتوشیمی و اثرات ضد میکروبی گیاه خوشاروزه پایان نامه برای دریافت درجه دکتری در رشته داروسازی ، ص ۲۸-۲۳ .

Balsevich J., Constabel F. and Kurz W.G.W. (1982) Alkaloids of *Vinca major* cv. *Variegata. Planta medica* **44**: 91-93.

Plock A., Soko Lowska-Kohler W. and Presber W. (2001) Application of flowcytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *leishmania* SPP. *Exp. Parasitol*, **97**(3): 141-53.

Saldanha A.C., Romero G.A. and Guerra C. (2000) Comparative study between sodium stibogluconate BP 88 and meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis treatment II. *Biochemical and Cardiac Toxicity Rev Soc Baras Med Trop* **33**: 383-8.

Venerstrom J., Lovelace L. and Waits J.K. (1990) Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **34** (5): 918-24.

Yagoobi-Ershadi M.R. and Hanafi-Bojd A.A. (2001) Epidemiological studies in a new focus of cutaneous leishmaniosis due to Leishmania major in Ardestan town, central Iran. *Acta Trop,* 79(2); 115-21

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]

IN VITRO AND *IN VIVO* EVALUATION OF THERAPEUTIC EFFECTS OF *VINCA MAJOR* ALKALOIDS ON *LEISHMANIA MAJOR*

Assmar, M.[1], PhD; Farahmand, M.[1] , MSPH; Aghighi, Z.[1] , MSPH; Ghaemi, N.[2] , PhD; Ayatollahi, A.[3], PhD

Leishmaniasis affects 1.5-2 million people annually and has been recognized as a major public health problem by the World Organization.
In Iran the incidence rate of the disease among school children in Ardestan province was 3.2 per thousand. As no effective vaccine has been found yet, control of the disease depends on effective drug therapy. The pentavalent anitmonials (pentostam and glucantime) are the current drugs of choice, but their use has been associated with side effects and a certain degree of toxicity. Furthermore, resistance towards these medications is not uncommon. For these reasons we studied the effectiveness of *Vinca major* alkaloids in treating *Leishmania major* infections both in vitro and invivo. Vinca has been used for centuries as a traditional remedy in the treatment of various diseases.
The effectiveness of different concentrations of Vinca on *Leishmania major* promastigotes was evaluated and the results showed a significant decrease in the number of promastigotes with higher concentrations and increasing exposure times ($P<0.005$).
Results of *in vivo* trials showed that intralesional injections of purified extracts in chlorofromic phase induced a significant decrease in the mean lesion diameter in Balb/c mice compared to the untreated group.

Key words: *Vinca* alkaloid, *Leishmania major*, Therapeutic effect, Balb/c.

[1] Department of Parasitology, Inistitute of Pasture, Iran
[2] Tehran University of Medical Sciences.
[3] Faculty of Pharmisy, Shahid Behashti University of Medical Sciences.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-25]