Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The *in vitro* effect of alcohlic extract of *Laurus nobilis* leaves on *Leishmania major* promastigote stage by colorimetric assay

Iman Nik Aein

MSc Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Tel: 09375278203, E-mail: nikan9293@gmail.com

Gholam Reza Sharifi-Sirchi

* Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Tel: 09131951969, E-mail: sharifisirchi@yahoo.com

Iraj Sharifi

Faculty member of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Tel: 03433257316, E-mail: iraj.sharifi@yahoo.com

Abstract

Objective

Leishmaniasis is one of the most prevalent parasitic unicellular diseases worldwide, which is common between human and animal. At present, antiviral compounds such as glucantime and amphotericin B are used to treat cutaneous leishmaniasis. In many cases, herbal remedies do not have any side effects and are both affordable and inexpensive. Therefore, finding a herbal medicine to treat leishmaniasis is one of the global goals. The aim of this study was to evaluate the anti-leishmanial activity of alcoholic extract of leaves of bay laurel (*Laurus nobilis*) on promastigote stage of *Leishmania major* by *in vitro* colorimetric method.

Materials and methods

Different concentrations of leaf extract of bay laurel were studied against *L. major* promastigotes compared to amphotericin B. *L. major* promastigotes were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10 Percent FBS. Optical absorption (OD) was measured by ELISA method to determine 50 Percent inhibitory concentration (IC50) of drugs. Promastigotes were added to the 96-well plate and incubated for 72 h with different concentrations of bay laurel leaf extract and amphotericin B (800, 600, 400, 200, 50, 25 and 10 µg ml^{-1}). Flow cytometry was used to evaluate

apoptosis. All concentrations were incubated in MTT assay for 3 min and flow cytometric for 2 h. Statistical data were analyzed by Duncan, ANOVA and SAS software at P≤0.05.

Results

Maximum amount of apoptesis (97.35 Percent) in amphotericin B treatments as positive control was related to treatment 800 µg ml^{-1} concentration. In leaf extract treatments of bay laurel, greatest amount of apoptosis (63.04 Percent) was related to treatment of 800 µg ml^{-1} concentration. CC_{50} of amphotericin B and leaf extract of bay laurel treatments was obtained in 129.6 and 200.5 µg ml^{-1} concentrations, respectively. Inhibitory concentration (IC50) of amphotericin B and leaf extract of bay laurel treatments was 18.5 and 589.5 µg ml^{-1} on *L. major* promastigotes.

Conclusions

The results were shown increased dose-dependent apoptosis based on flow cytometric. The results of this study showed that proximity of *L. major* promastigotes and amphotericin B concentration treatments leads to apoptosis-like cell death, which increases with increasing drug concentration. According to the IC50 results of leaf extract of bay laurel and high its apoptetic efficiency, further studies are needed to evaluate its effective combinants of leaf extract on *Leishmania* parasite and also, to design clinical setting for this herbal drug.

Keywords: Amphotericin B, Apoptosis, Colorimetric method, *Laurus nobilis*, *Leishmania major*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Nik Aein I, Sharifi-Sirchi G R, Sharifi I (2021) The *in vitro* effect of alcohlic extract of *Laurus nobilis* leaves on *Leishmania major* promastigote stage by colorimetric assay. Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 75-92.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 75-92. DOI: 10.22103/jab.2021.16918.1282

Received: September 29, 2020. Accepted: January 24, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی اثر عصاره الکلی برگ گیاه برگ‌بو بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* از طریق روش رنگ سنجی در مدل برون‌تنی

ایمان نیک آئین

دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان، تلفن: ۰۹۳۷۵۲۷۸۲۰۳، ایمیل: nikan9293@gmail.com

غلامرضا شریفی سیرچی

* هیات علمی گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، تلفن: ۰۹۱۳۱۹۵۱۹۶۹، ایمیل: sharifisirchi@yahoo.com

ایرج شریفی

هیات علمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، تلفن: ۰۳۴۳۳۲۵۷۳۱۶، ایمیل: iraj.sharifi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۵

چکیده

هدف: لیشمانیوز، یکی از بیماری‌های انگلی گسترده در جهان، یک بیماری مشترک بین انسان و دام محسوب می‌گردد که توسط تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می شود. داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هر گونه عار ضه و از طرفی در د سترس و ارزان می‌باشند. از این رو پیدا کردن یک داروی گیاهی برای درمان لیشمانیوز یکی از اهداف جهانی است. این مطالعه به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره الکلی برگ‌های گیاه دارویی برگ‌بو، روی مرحله پروما ستیگوت *لیشمانیا ماژور* با روش رنگ سنجی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای تعیین سمیت عصاره بر سلول‌های ماکروفاژ از روش MTT و خوانش با الایزا و برای تعیین اثر آنتی پروما ستیگوتی ع صاره از روش برر سی آپوپتوز با فلو سایتومتری ا ستفاده شد. میزان CC_{50} و IC_{50} از طریق نتایج این دو ت ست

محا سبه شدند و در هر دو ت ست از آمفوتریسین به عنوان کنترل مثبت ا ستفاده شد. برای این منظور، پروما ستیگوت‌ها به همراه غلظت‌های مختلف عصاره برگ برگ بو و آمفوتریسین B بر روی پلیت ۹۶ خانه اضافه و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس ارزیابی ها برا ساس آزمون‌های فوق صورت پذیرفت. داده‌های آماری با ا ستفاده از روش دانکن، ANOVA و نرم افزار SAS در سطح احتمال $P\leq0/05$ آنالیز شدند.

نتایج: بیشترین مقدار آپوپتوز مربوط به تیمار ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که به‌ترتیب در آمفوتریسین B ۹۷/۳۵ و عصاره برگ‌بو ۶۳/۰۴ در صد بود. غلظتی از دارو که از ر شد ۵۰٪ سلولها جلوگیری می‌کند (CC_{50})، برای آمفوتریسین B ۱۲۹/۶ و برای برگ‌بو ۲۰۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. میزان IC_{50} پروماستیگوت در آمفوتریسین و برگ‌بو به‌ترتیب به‌طور میانگین ۱۸/۵ و ۵۸۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره برگ گیاه برگ‌بو با افزایش غلظت از رشد پروماستیگوت‌ها جلوگیری کرده و در بعضی از غلظت‌ها با یکدیگر و با داروی آمفوتریسین B تفاوت معنی‌داری دا شتند. بر ا ساس نتایج فلو سایتومتری، افزایش آپوپتوزیس وابسته به دوز دیده شد. با توجه به نتایج IC_{50} گیاه برگ‌بو، اثر بخشی بالایی نشان داد. لذا مطالعات بیشتری برای ارزیابی تاثیر آن بر روی انگل لیشمانیا در شرایط بالینی بسیار مطلوب است.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوزیس، آمفوتریسین B، برگ‌بو، روش رنگ سنجی، *لیشمانیا ماژور*.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: نیک آیین ایمان، شریفی سیرچی غلامرضا، شریفی ایرج (۱۴۰۰) بررسی اثر عصاره الکلی برگ گیاه برگ‌بو بر پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* از طریق روش رنگ سنجی در مدل برون‌تنی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۱)، ۹۲-۷۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

در طول دهه ۱۹۷۰، بیوتکنولوژی از تلفیق بیولوژی و تکنولوژی حاصل گردید. از بیوتکنولوژی تحت عنوان انجام و استفاده از فرایندهای بیولوژیکی جهت بهبود زندگی بشر نیز یاد می‌شود. شاید بتوان گفت که مهمترین دستاورد بیوتکنولوژی در زمینه سلامتی حا صل گردیدها ست. به‌طوری که تا سال ۲۰۰۴، بیش از ۵۰۰ دارو و اک سن تولید شده از طریق بیوتکنولوژی وارد بازار

گردیده و نیز حدود ۶۰۰ تشخیص بیوتکنولوژیکی و حدود ۱۳۰ پروتکل ژن درمانی به‌وسیله VSP[1] تصویب شد (Sharifi and Kazemipour 2009). استفاده از گیاهان دارویی سابقه‌ای طولانی دارد. مصری‌ها و چینی‌ها بیش از ۲۷ قرن قبل از میلاد حضرت مسیح از گیاهان دارویی استفاده کرده‌اند. گیاه درمانی در قرن هشتم تا دهم میلادی، به همت دانشمندانی چون ابن سینا و رازی، رونق زیادی داشت (Omidbeygi 2011). از سال ۱۹۸۱ تا سال ۲۰۱۴، سه‌چهارم داروهای جدید مورد استفاده در جوامع انسانی را داروهایی با منشا طبیعی و گیاهی تشکیل می‌دهد و صنایع داروسازی جهان تلاش می‌کنند ساخت شیمیایی اقلام مربوط به یک‌چهارم بقیه داروها نیز به تدریج منسوخ و به منابع طبیعی و گیاهی متکی گردد (Newman and Cragg 2016). لیشمانیوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام محسوب می‌گردد که توسط تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود (Markell et al. 2006). این بیماری یکی از بیماری‌های مهم انگلی دنیا محسوب می شود که جزء سه بیماری اول (تریپانوز و میازیس آفریقایی، تب دانگ، لیشمانیوز) مرکز تحقیقات بیماری‌های گرمسیری دنیا طبقه‌بندی شده است (Desjeux 2001; Fard et al. 2003; Desjeux 2004). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO)، در حال حاظر بیش از یک بیلیون نفر در مناطق اندمیک این بیماری در معرض خطر ابتلا به این بیماری زندگی می‌کنند و هر ساله بیش از یک میلیون نفر به گونه های مختلف ایشمانیوز مبتلا می‌شوند (WHO 2021). داروهای خط اول در درمان این بیماری‌ها ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی از جمله، مگلومین آنتیمونات[2] (گلوکانتیم) و سدیم- استیبوگلوکانات[3] (پنتوستام) می‌باشند (Minodier and Parola 2007; Croft et al. 2006)، که از ۶۰ سال قبل تاکنون به‌عنوان داروی انتخابی همواره مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Croft et al. 2006). با توجه به این که داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هر گونه عارضه هستند و از طرفی در دسترس و ارزان می‌باشند، این موضوع ضرورت استفاده از گیاهان بومی هر منطقه را بدین منظور مورد تاکید قرار می‌دهد (Lamidi et al. 2005). برخی محصولات طبیعی، به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات ضد لیشمانیایی محسوب می‌شوند (Williams et al. 2003; Bouvier et al. 1987). نتایج مطالعه اثر ضد لیشمانیایی گیاه اسطوخودوس نشان داد که سرعت تکثیر پروماستیگوت‌ها پس از افزودن اسانس گیاه به‌میزان قابل توجهی نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($P<0/05$). در غلظت‌های ۱۰ درصد و بیشتر ا سانس گیاه ا سطوخودوس، اثرک شندگی نیز م شاهده شد، به‌طوری که در زمان ۷۲ ساعت هیچ انگل زنده‌ای در گروه‌های مذکور مشاهده نشد (Bonyadian et al. 2015). در مطالعه دیگری تاثیر عصاره‌های آبی دو گیاه درمنه و تشنه داری بر رشد *لیشمانیا ماژور* نشان داد که پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در محیط کشت RPMI–1640 محتوی غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ درصد درمنه، در همان روز اول به‌طور کامل از بین رفتند. در حالی که تشنه‌داری در غلظت ۲۵ درصد و در روز سوم باعث مرگ انگل گردید (Dalimi et al. 2013). تاثیر عصاره الکلی زرشک بر زخم ناشی از *لیشمانیا ماژور* در موش BALB/C نشان داد که در غلظت

1. An international science publisher
2. Meglumine Antimonate
3. Sodium Stibogluconate

۲۰ درصد پس از پایان دوره درمان میانگین قطر زخم کاهش داشت، به‌طوری که بهبود کامل زخم در این گروه در ۵ سر موش (۲۷/۷ درصد) مشاهده گردید (P<0/001). همزمان با کاهش قطر زخم، میانگین وزن موش‌ها افزایش داشت (P<0/001)، همچنین بار انگلی به‌میزان ۸۰ درصد کاهش داشت، به‌طوری که در ۱۲ سر موش محو کامل جسم لیشمن مشاهده شد (P<0/001) (Kazemi et al. 2007). تاثیر بابونه بر بهبودی زخم لیشمانیوز جلدی ناشی از *لیشمانیا ماژور* در موش‌های BALB/C نشان داد که زخم در ۵۸/۳ درصد گروه دریافت کننده جوشانده بابونه و ۸۰ درصد گروه دریافت کننده گلوکانتیم بهبود یافت، اما درگروه شاهد بهبودی زخم حاصل نشد (Dashtpeyma et al. 2015). در مطالعه‌ای با بررسی اثر عصاره الکلی گیاه ترشک (Rumex) بر روی لیشمانیوز پوستی ناشی از *لیشمانیا ماژور* در موش‌های BALB/C مشاهده شد که پنج هفته پس از تزریق انگل، میانگین قطر زخم‌ها در غلظت ۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاهش داشته و بهبود کامل زخم‌ها هم در این گروه مشاهده شد. همچنین بار انگلی در این گروه در مقایسه با گروه دریافت‌کننده گلوکانیتم به‌طور معنی‌داری ($P\leq 0/05$) کاهش نشان داد (Noorsabaghi et al. 2016). با بررسی فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره‌های درخت زیتون مشاهده شد که هیدروکسی تیروزول بیشترین اثر ضد لیشمانیایی بر علیه فاز ایستایی و فاز رشد تصاعدی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* را دارد (به ترتیب ۴/۸ $\pm$ ۵۰/۱ و ۱۳ $\pm$ ۱۰۵ میکروگرم بر میلی‌گرم) (Kyriazis et al. 2013). تاثیر ضد لیشمانیایی عصاره‌های آبی و متانولی *اکالیپتوس کامالدولنسیس* بر علیه *لیشمانیا ماژور* در شرایط *in vitro* نشان داد که عصاره متانولی بهتر از عصاره آبی بود. اگر چه تفاوت معنی‌داری نداشتند. عصاره‌ها در مقایسه با داروی کنترل کم اثرتر بودند (Nosratabadi et al. 2015). در مطالعه دیگر با بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ سنجی به صورت برون‌تنی (*In vitro*) دریافتند اگر چه داروی تار تارامتیک در مقایسه با این عصاره‌ها تاثیر بیشتری نشان داد اما همه این عصاره‌ها بر فرم پروما ستیگوت لیشمانیا ماژور تاثیر قابل ملاحظه‌ای نشان دادند (Barati et al. 2009). این تحقیق به‌منظور بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره برگ‌های گیاه برگ‌بو، روی *لیشمانیا ماژور* با استفاده از روش رنگ سنجی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره الکلی: برگ‌های گیاه برگ‌بو از اطراف شهرستان کرمان جمع‌آوری شد. نمونه‌های برگی پس از شستشو در شرایط سایه و دمای اتاق خشک، و سپس آسیاب شدند، از پودر حاصله با استفاده از حلال اتانول ۹۶ درصد به‌وسیله دستگاه سوکسله Fine Tech (ساخت کره جنوبی)، عصاره‌های گیاهی استخراج شدند. عصاره‌ها توسط دستگاه روتاری Eyel 4 (ساخت ژاپن) به‌مدت یک ساعت تغلیظ و در زیر هود لامینار به آرامی خشک و سپس در دمای یخچال نگهداری شدند.

تهیه و آماده سازی انگل لیشمانیا ماژور سویه استاندارد: کرایوتیوب حاوی پروماستیگوت‌های سویه استاندارد *لیشمانیا ماژور* (MRHO/IR/75/ER) گرفته شده از انستیتو پاستور تهران از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج و حدود ۲ دقیقه

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

در حمام آب گرم (بن‌ماری) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروماستیگوت‌های ذوب شده در شرایط استریل و در زیر هود به محیط کشت جدید حاوی RPMI کامل منتقل گردیدند. و حرکات انگل در نمونه‌ای از آنها در زیر میکرو سکوپ مورد برر سی قرار گرفت که نمونه های دارای حرکات انگل زنده محسوب شدند. کشت‌ها هر روز در زیر میکروسکوپ Invert آزمایش شدند و چنانچه تا ۷۲ ساعت انگل زنده‌ای وجود نداشت، یک پاساژ به‌منظور حذف بقایای احتمالی مواد نگهداری شده، انجام گردید. لوله‌های حاوی پروماستیگوت‌های سویه استاندارد *لیشمانیا ماژور* و تیمارها در ۲۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ روز انکوبه شدند و هر روز محیط حاوی انگل به‌مدت ۴۵-۲۰ دقیقه شیکر و سپس میزان ر شد انگل با میکرو سکوپ Invert برر سی شد. هر روز بالام نئوبار تعداد انگل شمارش گردید؛ به این ترتیب که ۱۰۰ لاندا از محیط حاوی انگل برداشت و با ۱۰۰ لاندا از رنگ تریپان بلو مخلوط شد، یک قطره برداشته‌شد و با لام نئوبار به شمارش آن در یکی از خانه‌های شانزده تایی پرداخته‌شد و با استفاده از فرمول زیر تعداد تقریبی انگل در هر میلی لیتر محاسبه شد:

تعداد انگل در هر میلی‌لیتر= عکس ضریب رقت در تعداد انگل شمارش شده در خانه‌های شانزده‌تایی × 10^4

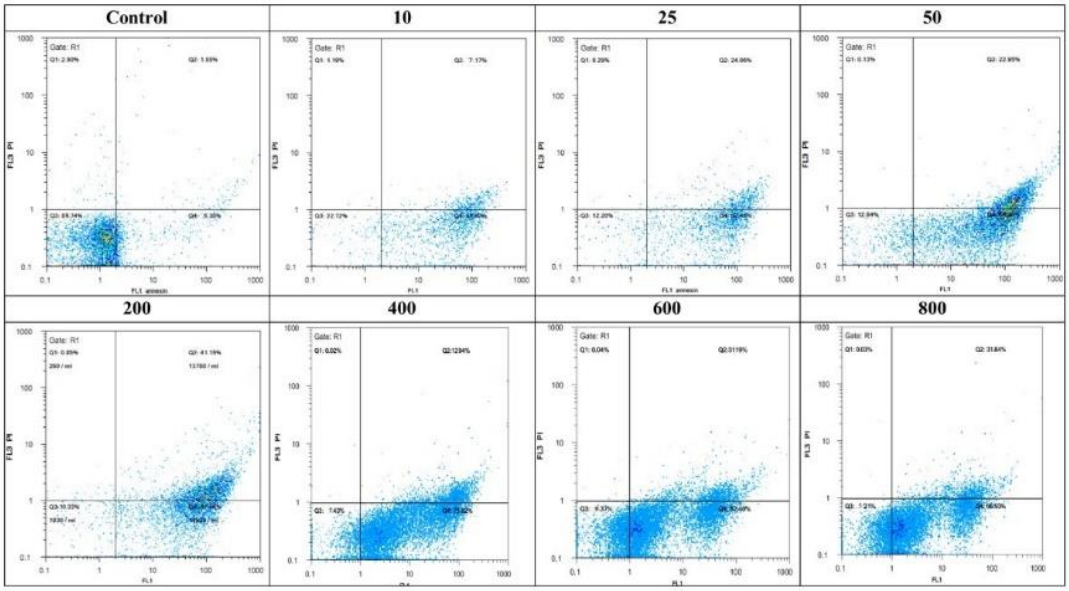
سنجش میزان آپوپتوزیس: جهت تعیین کمی میزان آپوپتوزیس سلول‌ها، ازکیت تشخیص آپوپتوز Mabtag استفاده شد و طبق دستورالعمل کیت به‌وسیله‌ی دو فاکتور Annexin V- FITC, PI، سلول‌ها و انگل‌ها رنگ‌آمیزی شدند و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری Sysmex آنالیز شدند. برای انجام این سنجش ابتدا در میکروتیوب‌های استریل، نمونه‌های تست که حاوی حدود یک میلیون انگل در یک سی سی از حجم کل واکنش بودند، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف دارو به‌ترتیب به میکروتیوب‌ها اضافه شد. غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم میلی‌لیتر آمفوتریسین B و برگ‌بو به میکروتیوب‌های استریل مخصوص خود افزوده شد. دو تا از میکروتیوب‌ها به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شدند و به آن‌ها فقط همان تعداد انگل اضافه شد و سپس حجم کل واکنش با استفاده از محیط کشت RPMI- 1640 به‌همراه ۱۰ درصد FBS به یک سی سی رسانده شد. سپس تمامی میکروتیوب‌ها به انکوباتور ۲ $\pm$ ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. پس از طی این زمان میکروتیوب‌ها با دور rpm ۱۴۰۰۰ و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته‌شد و رسوب تحتانی همه میکرتیوب‌ها به وسیله محلول PBS [۲] سه مرتبه شستشو داده شد. سپس به رسوبی که سه مرتبه شستشو داده شده بود، محلول buffer binding و آنتی‌بادی مخصوص کیت PI, Annexin V اضافه و مخلوط شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در محلی تاریک و با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از انکوباسیون با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری در طول موج تهییج ۵۷۰ و انتشار ۶۳۰ نانومتر قرائت شدند. در نهایت داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Flomax آنالیز و درصد آپوپتوز مربوط به هر کدام از داروها و غلظت‌ها محاسبه شد.

1. phosphate buffered saline

سنجش میزان سمیت دارو: ماکروفاژهای J774-A.1 موشی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در محیط کشت RPMI1640 کشت و تکثیر شدند (درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۸ درصد بود که قابل قبول جهت شروع آزمایش بود). برای سنجش میزان سمیت دارو، در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ۹۰ میکرولیتر از سلول‌های ماکروفاژ موشی J774-A.1 که حاوی ۱۰ هزار سلول است ریخته شد و به هر یک از آن‌ها به‌صورت تکرارهای سه‌تایی و به‌ترتیب غلظت‌های مختلف داروها (آمفوتریسینB و برگ‌بو) به‌میزان ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. در سه خانه‌ی اول پلیت به جای دارو، محیط کشت اضافه و به‌عنوان کنترل استفاده شدند. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ در صد CO_2 به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها را از انکوباتور خارج شدند و در زیر هود و در کنار شعله (شرایط استریل) مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که قبلا تهیه شده‌بود و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد و به‌مدت ۳۰ ثانیه شیکر شدند تا به‌طور کامل مخلوط گردندند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت درون انکوباتور بازگردانده شدند و نگهداری شدند و پس از طی این زمان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آن‌ها افزوده‌شد و بلافاصله با دستگاه الایزا ریدر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر میزان جذب نوری آن‌ها را قرائت شدند.

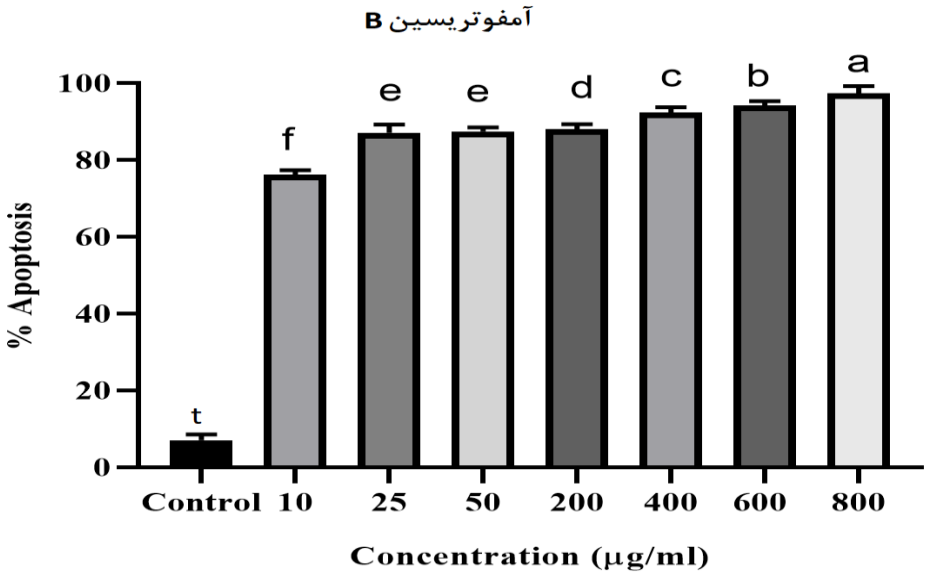
نتایج و بحث

این بررسی نشان داد که بر اثر مجاورت دارو و انگل، پروماستیگوت‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوزیس شدند که درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با افزایش غلظت‌های دارویی افزایش یافت، از غلظت ۱۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریپسین B میزان آپوپتوزیس رو به افزایش بود و اختلاف تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0/05$) معنی‌دار بود و غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0/05$) نداشتند (شکل ۲ و ۱). میزان آپوپتوز تیمار کنترل تقریبا ۷ درصد بود. آمفوتریپسین B در غلظت‌های ۸۰۰، ۶۰۰، و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان آپوپتوز را سبب شد و این تیمارها به‌ترتیب در کلاس‌های A، B، و C قرار گرفتند (شکل ۲ و ۱). تیمارهای غلظتی ۱۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ گیاه برگ‌بو سبب اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0/05$) در میزان آپوپتوزیس پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* شدند (شکل ۴ و ۳). عصاره الکلی برگ‌های برگ‌بو در غلظت‌های ۸۰۰، ۶۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان آپوپتوز در بین غلظت‌های مختلف عصاره برگی برگ‌بو را داشتند و در کلاس‌های H، J و M قرار گرفتند (شکل ۴ و ۳).



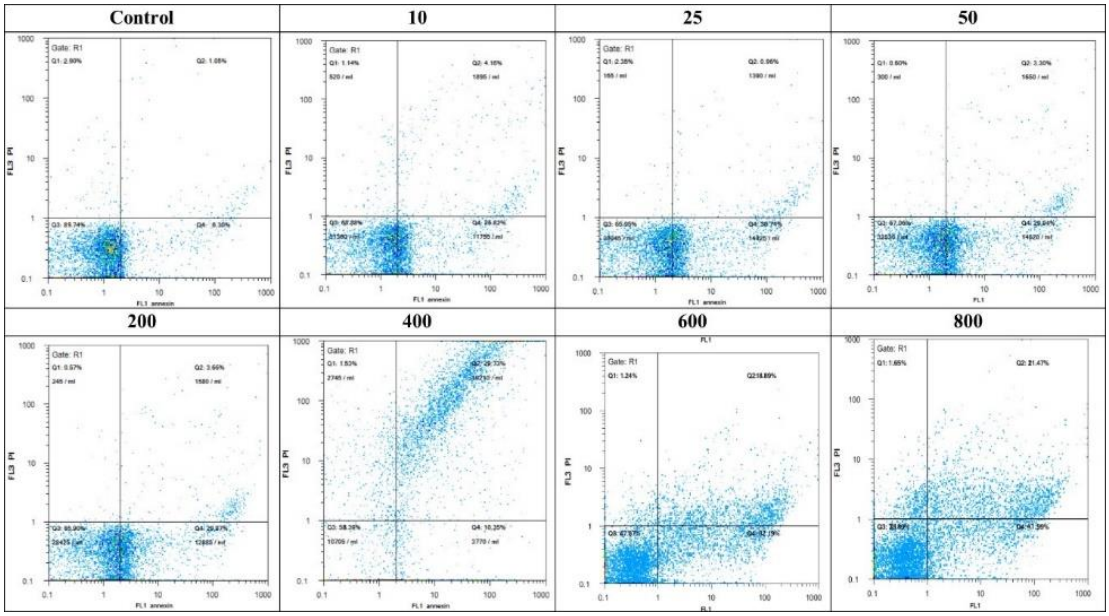
شکل ۱. نتایج فلوسایتومتری آپوپتوز پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* بر اثر غلظت‌های مختلف آمفوتریسین B و کنترل

Figure 1. The flow cytometric results of treated apoptetic promastigote cells of *Leishmania major* by different concentration of amphotericin B and control



شکل ۲ . نمودار فلوسایتومتری آپوپتوز پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* بر اثر غلظت‌های مختلف آمفوتریسین B و کنترل

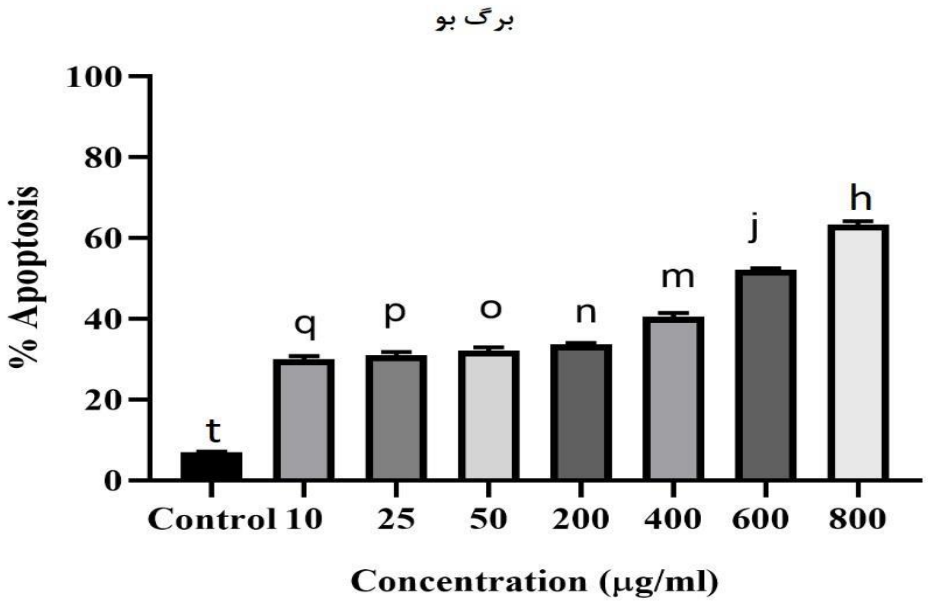
Figure 2. Diagram of flow cytometric results of treated apoptetic promastigote cells of *Leishmania major* by different concentration of amphotericin B and control



شکل ۳ . نتایج فلو سایتومتری آپوپتوز پروما ستیگوت *لیشمانیا ماژور* بر اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ‌های برگ‌بو و کنترل

Figure 3. The flow cytometric results of treated apoptetic promastigote cells of *Leishmania major* by different concentration of alcoholic extract of leaves of bay laurel (*Laurus nobilis*) and control

سیتوتوکسیستی تیمارها در مقایسه با هم به‌منظور بررسی سمیت و اثر سایتوتوکسیسیتی داروها: در این مطالعه، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد و نتایج به این صورت بودند که غلظتی از دارو که از رشد ۵۰ درصد سلول‌ها جلوگیری می‌کند (CC_{50})، برای آمفوتریسین B برابر ۱۲۹/۶، برای برگ‌بو ۲۰۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین میزان IC_{50} پروماستیگوت یعنی میزانی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰ درصد از انگل‌ها می‌شود، برای آمفوتریسین B و برگ‌بو به‌ترتیب برابر با ۱۸/۵ و ۵۸۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. شاخص بین المللی SI برای آمفوتریسین B و برگ‌بو به‌ترتیب برابر با ۷ و ۰/۳۴ است (جدول ۱). نتایج فلو سایتومتری انجام شده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت داروها، افزایش میزان آپوپتوزیس اتفاق می‌افتد و در غلظت‌های بالاتر میزان آپوپتوزیس قابل ملاحظه می‌باشد. که احتمالا به‌دلیل دوز بیشتر به‌کار رفته از ترکیبات موثر ضد انگلی موجود در عصاره می‌باشد. تاثیر غلظت‌های عصاره برگ برگ‌بو در مقایسه با کنترل مثبت دارای اثر معنی‌دار می‌باشند (۹۵ درصد).



شکل ٤. نمودار فلو سایتومتری آپوپتوز پروما ستیگوت *لیشمانیا ماژور* بر اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ‌های برگ‌بو و کنترل. علامت بار روی هر ستون، میزان یک انحراف استاندارد داده ها از میانگین را نشان می‌دهد

Figure 4. Diagram of flow cytometric results of treated apoptetic promastigote cells of *Leishmania major* by different concentration of leaves of bay laurel (*Laurus nobilis*) and control. Bar signs on columns show ±1 standard deviation

اگر چه داروی آمفوتریسین B در مقایسه با این عصاره تاثیر بیشتری نشان داد، اما عصاره برگ‌بو بر فرم پروما ستیگوت *لیشمانیا ماژرو* تاثیر قابل ملاحظه‌ای نشان داد. عصاره برگ‌های برگ‌بو و داروی آمفوتریسین B هر دو رشد پروما ستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* را در شرایط آزمایشگاهی مهارکردند. میزان IC_{50} آمفوتریسین و برگ‌بو در پروماستیگوت به‌ترتیب به‌طور میانگین ۱۸/۵ و ۵۸۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. میزان آپوپتوزیس (حضور فسفاتیدیل سرین بر سطح غشا سلولی) در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب در داوری کنترل (آمفوتریسین‌B) ۹۷/۳۵ و عصاره برگ‌بو ۶۳/۰۴ درصد می‌باشد. طبق نتایج تحقیقی بر روی ۹ عصاره آبی گیاه مورد آزمون، عصاره آبی گیاه برگ‌بو و ریحان دارای ترکیبات فنولی بالایی نسبت به دیگر عصاره‌های آبی گیاهان مورد آزمایش بوده‌اند. می‌توان گفت که ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی اکسیدانی گیاه وجود دارد. نتایج نشان می‌دهد که هر چقدر میزان فنول بیشتر باشد، عصاره خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری دارد (Salmanian et al. 2013).

جدول ۱. میزان IC_{50} ، CC_{50} و شاخص SI آمفوتریسین B و عصاره برگ‌های گیاه برگ‌بو روی سلول‌های پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور*

Table 1. Amount of IC_{50}, CC_{50}, and SI index of amphotericin B and leaves extract of bay laurel (*Laurus nobilis*) on promastigote cells of *Leishmania major*

Compound	IC50[a] میانگین ± انحراف معیار Average ± Standard deviation	$CC50^b$	SI^C
آمفوتریسین B amphotericin B	0/22 ± 18.5	129.6	7.00
برگ‌بو *Laurus nobilis*	14.84 ± 589.5	200.5	0.34

a= غلظتی از دارو که باعث از بین رفتن ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* می‌شود، b= غلظتی از دارو که از رشد ۵۰ درصد سلول‌ها جلوگیری می‌کند و C= شاخص انتخابی پروماستیگوت (CC_{50}/IC_{50})

مطالعه‌ای دیگر نشان داد که عصاره آبی برگ برگ‌بو اثر ضد باکتریایی زیادی بر باکتری‌های *اشریشیا کلی* (۱۸±۰ میلی‌متر) و *استافیلو کوکوس اورئوس* (۱۸±۰ میلی‌متر) داشت. این نتایج نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی زیاد عصاره برگ برگ‌بو است. میزان IC_{50} عصاره آبی برگ برگ‌بو ۲/۸۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد که نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی بالای آن می باشد (Azimzade et al. 2017). در مطالعه‌ای نشان دادندکه عصاره الکلی گیاه برگ برگ‌بو در شرایط آزمایشگاهی اثر مهاری قابل ملاحظه‌ای بر پاتوژن‌های باکتریایی و *کاندیدا آلبیکنز* داشت (Keskin et al. 2010). تحقیق دیگری نشان داد اسانس گیاه برگ‌بو خاصیت ضد میکروبی بیشتری در مقایسه با اسانس گیاه مُورد علیه ۸ گونه باکتری دارد (Cherrat et al. 2014). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که عصاره برگ گیاه برگ‌بو خاصیت ضد میکروبی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی* داشت و با افزایش غلظت عصاره برمیزان قطر هاله عدم رشد افزوده گردید. در حالی که بر قارچ آسپرژیلوس نایجر تاثیری نداشت و هاله‌ای تشکیل نشد. عصاره برگ گیاه برگ‌بو بر باکتری‌های گرم مثبت تاثیر بیشتری نسبت به گرم منفی‌ها داشت. اسید لینولنیک ($C_{18:3}$)، اسید پالمیتیک ($C_{16:0}$) و اسید پالمیتولئیک، اسیدهای چرب عمده تشکیل دهنده ساختار عصاره برگ گیاه برگ‌بو بودند. در بین توکوفرول‌ها، گاما و بتا توکوفرول با ۵۷/۳۹ در صد دارای بیشترین مقادیر و آلفا توکوفرول ۱۳/۸۲ در صد و دلتا توکوفرول ۷/۳۱ در صد سایر اجزا شناسایی شده توکوفرولی عصاره بودند. در بین استرول‌ها، بالاترین میزان به بتا سیستواسترول با ۷۵/۱۷ درصد تعلق داشت و پس از آن بتولین، کامپسترول، سیگما استرول و کلسترول سایر ترکیبات استرولی شناسایی شده در عصاره برگ گیاه برگ‌بو بودند که از نظر مقداری

به‌ترتیب برابر با ۱۹/۴۷، ۹/۱۲، ۲/۳۱ و ۰/۵۴ درصد می‌باشند. با افزایش غلظت‌های مختلف عصاره، میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی از ۳۴/۷۱ میلی گرم اسیدگالیک در گرم عصاره در غلظت ppm ۲۰۰ تا ۷۶/۱۲ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره در غلظت ppm ۱۶۰۰ عصاره برگ گیاه برگ‌بو افزایش یافت و این افزایش در تمام غلظت‌های عصاره نسبت به نمونه شاهد با مقدار ۱۶/۳۳ ترکیبات پلی فنلی، در سطح احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار بود ($p<0/05$) (Pedramnia et al. 2018). نتایج حاصل از آزمایشی بیانگر این بود که بین ترکیبات فنولی با اثر ضد میکروبی گیاهان ارتباط وجود دارد (chaleshtor Sharafati et al. 2009).

عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده‌ی آن‌ها احتمالا منبع غنی از عوامل دارویی جدید را فراهم می‌کنند (Mishra et al. 2009; Bouvier et al. 1987). یکی از ویژگی‌های مهم عصاره‌های گیاهی مرتبط با خاصیت آب گریزی آن‌ها است که عصاره‌های گیاهی را قادر می‌سازد تا با پیوند روی لایه لیپیدی غشا سلولی باکتری‌ها و میتوکندری آن‌ها باعث پاره شده غشا سلولی و خروج مولکول‌ها و یون‌های مهم باکتری به خارج از سلول و در نهایت مرگ باکتری می‌گردد (Pedramnia et al. 2018). 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 می‌کنند (Poursafavi et al. 2018). مکانیسم عمده و اصلی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی، تخریب دیواره سلولی و آسیب به غشا سیتوپلاسمی و پروتئین‌های غشایی، کوآگولاسیون سیتوپلاسم[3] و نشت محتوای درون سلولی و در نتیجه مرگ سلول باکتری توسط ترکیبات فنولی بیان شده است (Salmanian et al. 2013).

نتیجه‌گیری: با توجه به‌نتایج تحقیق حاضر، علی‌الخصوص اثر بخشی بالا و نتایج IC_{50} عصاره برگی گیاه برگ‌بو، و انطباق آن با مطالعات گسترده بین‌المللی در مورد اثرات آنتی پاتوژنی عصاره برگ گیاه برگ‌بو که در بالا آورده شدند. پیشنهاد می‌گردد، مطالعات بیشتری برای تعیین و جداسازی ترکیبات موثره در درمان لیشمانیا ماژور انجام پذیرد. همچنین برای ارزیابی تاثیر آن بر روی انگل لیشمانیا در شرایط بالینی آزمایشات گسترده‌ای صورت پذیرد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه هرمزگان و مرکز تحقیقات لیشمانیوز دانشگاه علوم پزشکی کرمان به خاطر حمایت معنوی و همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

امیدبیگی ر (۱۳۹۰). تولید و فرآوری گیاهان دارویی (جلد اول). شرکت به نشر (انتشارات آستان قدس رضوی)، ۳۴۸-۲۰.

بنیادیان م؛ حجازی ح؛ عزیزی ح و دیگران (۱۳۹۴). اثر ضد لیشمانیایی اسانس گیاه اسطوخودوس علیه لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد ۱۷، ۱۰۱-۹۳.

3. Cytoplasm coagulation

براتی م؛ شریفی ی؛ شریفی‌فر ف (۱۳۸۸). بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ سنجی به صورت برون‌تنی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۱۷ (۱) :۴۱-۳۲.

پدرام نیا ا؛ مرتضوی س؛ نعمت شاهی م (۱۳۹۷). بررسی ترکیبات شیمیایی و اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه برگ‌بو بر روی سویه‌های مختلف میکروبی. علوم و صنایع غذایی ۱۵، ۲۲۶ – ۲۱۷.

پور صفوی ز؛ سید طبایی ج؛ خیراندیش ف و دیگران (۱۳۹۷). اثر عصاره آبی و هیدرو الکلی برگ زیتون بر آماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکای حساس و مقاوم به گلوکانتیم در شرایط(*In Vitro*). فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی۴۲ ، ۵۱-۴۶.

دشت پیما ع ؛ مشفع ع ؛ منظوری ل و دیگران (۱۳۹۴). اثر بابوبه بر بهبودی زخم لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور در موش‌های بالب سی، ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ۲۰، ۱۳-۱۲۷.

دلیمی ع؛ اربابی م ؛ ناصری فر ر (۱۳۹۲). بررسی تاثیر عصاره آبی دو گیاه Scrophularia Artemisia sieberi Besser striata Boiss بر رشد لیشمانیا ماژور در شرایط *In vitro*. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۹ ، ۲۴۶-۲۳۷.

سلمانیان ش؛ صادقی ماهونک ع؛ خمیری م؛ ماستری فراهانی م (۱۳۹۲). اسیدهای فنولی، فعالیت ضدرادیکالی و ضدمیکروبی عصاره متانولی برگهای اوجی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران ۸، ۱۵۴ – ۱۴۵.

شرافتی چالشتری ر؛ شرافتی چالشتری ف؛ شرافتی چالشتری ع؛ اشرفی ک (۱۳۸۸). بررسی اثر ضد میکروبی و تعیین میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فلاونولی عصاره اتانولی گل میمونی (*Scrophularia striata*). مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ۱۱، ۳۷ – ۳۲.

شریفی سیرچی غ ر؛ کاظمی‌پور ع (۱۳۸۸). بیوتکنولوژی: اصول و مبانی. دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۳۰۱ – ۲۰.

عظیم زاده ب؛ جهادی م؛ فاضل م (۱۳۹۶). خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره ی آبی گیاه برگ‌بو در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکولای. بهداشت مواد غذایی ۷ ، ۷۴-۶۵.

کاظمی ا؛ طالاری ص ع؛ هوشیار ح (۱۳۸۶). تاثیر عصاره الکلی زرشک بر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c . مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ۵ ، ۴۲-۳۵.

نور صباغی ف؛ عابدین‌زاده م؛ جلال‌لو ن (۱۳۹۵). بررسی اثر عصاره الکلی گیاه ترشک (Rumex) بر روی لیشمانیوز پوستی ناشی از لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) در موش‌های BALB/c. مجله علوم پزشکی رازی۲۳، ۳۵-۲۸.

References

Azimzadeh B; Jahadi M; Fazel M (2017). Antioxidant and antibacterial effects of laurus nobilis aqueous extract again Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Journal of Food Hygiene 7, 65 -74 (In Persian).

Barati M; sharifi I; sharififar F (2010). *In vitro* evaluation of anti-leishmanial activities of zataria multiflora boiss, peganum harmala and myrtus communis by colorimetric assay. Journal of Kerman University of medical sciences 17, 32 - 41 (In Persian).

Bonyadian M; Hejazi H; Azizi H et al. (2015). Antileishmania activity of Levandula officinalis essence against *Leishmania major* in in vitro media. J Shahrekord Univ Med Sci 17, 93-101 (In Persian).

Bouvier J; Etges R; Bordier C (1987). Identification of the promastigote surface protease in seven species of leishmania. Mol Biochem parasitol 24, 9-73.

Cherrat L; Espina L; Bakkali M et al. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. J Sci Food Agric 94, 1197-204.

Croft S L; Seifert K; Yardley V (2006). Current Scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res 123, 399-410.

Dalimi A; Arbabi M; Naserifar R (2013). The effect of aqueous extraction of artemisia sieberi besser and scrophularia striata boiss. On *leishmania major* under in vitro conditions. Iranian journal of medicinal and aromatic plants 29, 237-246 (In Persian).

Dashtpeima A; Moshfe A; Manzoori L et al. (2015). The Effect(s) of Matricaria chamomilla on *Leishmania major* Ulcers in Balb/c Mice. Armaghane danesh 20, 127-137 (In Persian).

Desjeux P (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 95, 239-243.

Desjeux P (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27, 305-318.

Fard MD; Kalantari M; Rassi Y; Javadian E (2003). The PCR- based detection of *Leishmania major* infection in Meriones libycus (Rodentia: Muridae) from southern Iran. An of Trop Med parasite 97,811-816.

Kazemi E; Talari S; Hooshyar H (2007). The effect of an alcoholic extract of *Berberis Vulgaris* on *Cutaneous leishmaniasis* (L. major) in BALB/c mice. Sjsph 5, 35-42 (In Persian).

Keskin D; Oskay D; Oskay M (2010). Antimicrobial activity of selected plant spices marketed in the West Anatolia. International journal of agriculture & biology 12, 916–920

Kyriazis J; Aligiannis N; Polychronopoulos P (2013). Leishmanicidal activity assessment of Olive tree extracts. Phytomedicine 20, 275-281.

Lamidi M; DiGiorgio C; Delmas F et al. (2005). In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. J Ethnopharmacol 102, 90-185.

Markell EK; Voge M A; John DT (2006). Medical parasitology (7th ed.) W. B. Saunders Company Philadelphia, 148-159.

Minodier P; Parola p (2007). Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med infect Dis 5, 8-150.

Mishra BB, singh RK, Srivastava A et al. (2009). Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. Mini reviews in medicinal chemistry 9, 107-23.

Newman Dj; Cragg GM (2016). Natural product as surces of new drugs from 1981 to 2014. J.Nat.Prod 79(3), 629-661.

Nosratabadi SJ; Sharifi I; Sharififar F; Bamorovat M; Daneshvar H; Mirzaie M (2015). *In vitro* antileishmanial activity of methanolic and aqueous extracts of *Eucalyptus camaldulensis* against *leishmania major*. J. Parasit Dis 39, 18-21.

Noursabaghi F; Abedinzade M; Jalallou N (2016). Evaluation the effect of Rumex alcoholic extract against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Balb/c mice. RJMS 23, 28-35 (In Persian).

Omidbeygi R (2011). Production and processing of medicinal plants (volume 1). Astan Quds Razavi. pp. 20-348 (In Persian).

Pedram Nia A; Mortazavi A; Nemat Shahi M (2018). Study of Chemical Compounds and The Antimicrobial Effects of Leaf Extract of *Laurus nobilis* L on Various Microbial Strains. JFST 81, 217 -226 (In Persian).

Poursafavi Z; Seyyed Tabaei S J; Kheirandish F et al. (2018). Effect of olive leaf aqueous and hydroalcoholic extract on Leishmania tropica Glucantime resistance and sensitivity *in vitro*. Research in Medicine 42, 46-52 (In Persian).

Salmanian Sh; Sadeghi Mahoonak AR; Khomeiri M; Masteri Farahani MR (2013). Phenolic acid content, antiradical and antimicrobial properties of *Mentha aquatic* leaf methanolic extract. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 8, 145 – 154 (In Persian).

Sharafati chaleshtori R; Sharafati chaleshtori F; Sharafati chaleshtori A; Ashrafi K (2009). Antimicrobial effects and evaluation of total phenols, flavonoids and flavonols contents of ethanolic extracts of *Scrophularia striata*. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 11, 32 – 37 (In Persian).

Sharifi G R; Kazemipour A (2009). Biotechnology: principles. Shahid bahonar university of Kerman publication, 20 – 301 (In Persian)..

World Health Organization (20۲۱). W.H.O. Statistical Information System. Geneva, Switzerland. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.

Williams C; Espinosa O. A; Montenegro H et al. (2003). Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for leishmania. J. Microbiol Methods 55, 6-813.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500