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

Evaluation of the *in vitro* effect of alcoholic extract of *Nepeta ispahanica L.* leaves on *Leishmania major* promastigote stage by colorimetric assay

Iman Nik Aein

M. Sc. Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, and Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: nikan9293@gmail.com

Gholam Reza Sharifi

Professor, Department of Agricultural Biotechnology Engineering, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: sharifi@uk.ac.ir

Iraj Sharifi

Professor, Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. E-mail: iraj.sharifi@yahoo.com

Abstract

Objective

Leishmaniasis is one of the most prevalent parasitic unicellular diseases worldwide, which is caused by the *Leishmania* genus. Currently, pentavalent antimony compounds such as Glucantime and amphotericin B are used to treat cutaneous leishmaniasis. In many cases, herbal remedies have no adverse effects and are both affordable. Therefore, finding an herbal medicine to treat leishmaniasis is one of the global objectives. This study aimed to evaluate the anti-leishmanial activity of *Nepeta ispahanica L.* leaves alcoholic extract on promastigote stage of *Leishmania major* by *in vitro* colorimetric method.

Materials and methods

Different concentrations of *Nepeta ispahanica L.* leaf extract were used 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 the ELISA method to determine the 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 the MTT assay for 3 min and the flow cytometric assay for 2 h. Statistical data were analyzed by Duncan, ANOVA, and SAS software at $P \leq 0.05$.

Results

In *N. ispahanica L.* leaf extract treatments, the greatest amount of apoptosis (42.47 Percent) was related to treatment of 800 μg mL^{-1} concentration. Maximum amount of apoptosis (97.35 Percent) in amphotericin B treatments as positive control was related to treatment 800 μg mL^{-1} concentration. CC_{50} of Amphotericin B and leaf extract of bay laurel treatments was obtained in 129.6 and 162 μg mL^{-1} concentrations, respectively. Inhibitory concentration (IC50) of amphotericin B and *N. ispahanica L.* leaf extract treatments were 18.5 and 2989.5 μg mL^{-1} on *L. major* promastigotes.

Conclusions

The results showed an increase in dose-dependent apoptosis based on flow cytometric analysis. Also, the proximity of *N. ispahanica L.* leaf extract and amphotericin B treatments in apoptosis-like cell death, which increases with increasing drug concentration. According to the IC50 results of *N. ispahanica L.* leaf extract and its high apoptotic efficiency, further studies are needed to evaluate of *N. ispahanica L.* leaf extract on *Leishmania* parasite and also, to design a clinical setting for this herbal drug.

Keywords: Amphotericin B, Apoptosis, Colorimetric method, *Leishmania major*, *Nepeta ispahanica*

Paper Type: Research Paper.

Citation: Nik Aien, I., Sharifi, G. R., & Sharifi, I. (2025). Evaluation of the *in vitro* effect of alcoholic extract of *Nepeta ispahanica L.* leaves on *Leishmania major* promastigote stage by colorimetric assay. *Agricultural Biotechnology Journal,* 17(4), 51-70.

Agricultural Biotechnology Journal, 17(4), 51-70. DOI: 10.22103/jab 2025.23410.1567

Received: May 18, 2025. Received in revised form: July 13, 2025.

Accepted: July 14, 2025. Published online: November 30, 2025.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

Introduction

Leishmaniasis is one of the common diseases between humans and animals which is occurred by one of the prevalent parasitic unicellular organisms by genesis of *Leishmania*. Leishmaniasis is one of the world‘s health problems, especially in tropical and subtropical countries. Given that herbal medicines in many cases do not have any side effects and are also available and inexpensive, this emphasizes the necessity of using indigenous plants of each region to treat common diseases in that region. Some natural products, such as the extract of black pepper plant (*Sarcorhachis naranjoana* (Piperaceae) are considered a rich source of anti-leishmanial compounds. The results of a study showed the anti-leishmanial effect of lavender, which significantly reduced the rate of promastigote proliferation after adding the plant's essential oil compared to the control group ($P < 0.05$). In another study, the effect of aqueous extracts of Artemisia and Thirst on the growth of *Leishmania major* showed that *L. major* promastigotes in RPM1-1640 cultured medium were destroyed on the first day under the influence of 20% and 25% Artemisia extract concentrations. While Thirst caused the death of the parasite at a concentration of 25% extract and on the third day. By investigating the anti-leishmanial activity of olive tree extracts, it was shown that hydroxytyrosol has the highest anti-leishmanial effect against stationary and logarithmic growth stage promastigotes of *L. major* among all-natural compounds tested, 50.1 ± 4.8 and 105 ± 13 $\mu g\ mg^{-1,}$ respectively. This study was conducted to investigate the anti-leishmanial effects of the alcoholic extract of *Nepeta ispahanica* on *L. major* promastigotes. It was carried out by using a colorimetric method. The objectives of this research include the following statements: Does the extract of the medicinal plant *N. ispahanica* have anti-leishmanial properties? If this property exists in the extract, how does it affect compared to chemical drugs commonly used in medicine against *L. major,* such as amphotericin B, and what is the percentage of its inhibition and lethality on *Leishmania* promastigotes?

Materials and methods

Leaves of the *N. ispahanica* plant were collected from the native population in Sirch village of Kerman province of Iran. After washing, the leaf samples were dried in the shade at room temperature and then ground. The resulting powder was extracted using 96% ethanol solvent. It was carried out by the Fine Tech Soxhlet apparatus (made in Korea). The extracts were concentrated using an Eyel 4 rotary apparatus (made in Japan) for one hour, dried slowly under a laminar hood, and then stored at refrigerator temperature. Different concentrations of *N. ispahanica L.* leaf extract were used 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 the ELISA method to determine the 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 the MTT assay for 3 min and the flow cytometric assay for 2 h. Statistical data were analyzed by Duncan, ANOVA, and SAS software at $P \leq 0.05$.

Results

The results of this study showed that due to the proximity of the drug and the parasite, promastigotes undergo programmed cell death or apoptosis, and the percentage of programmed cell death increases with drug concentrations (*N. ispahanica L.* leaf extract and amphotericin B). In *N. ispahanica L.* leaf extract treatments, the greatest amount of apoptosis (42.47 Percent) was related to treatment of 800 μg mL^{-1} concentration. Maximum amount of apoptosis (97.35 Percent) in amphotericin B treatments as positive control was related to treatment 800 μg mL^{-1} concentration. CC_{50} of amphotericin B and leaf extract of bay laurel treatments was obtained in 129.6 and 162 μg mL^{-1} concentrations, respectively. Alcoholic leaf extract of *N. ispahanica L.* and amphotericin B both inhibited the growth of *L. major* promastigotes *in vitro*. Inhibitory concentration (IC50) of amphotericin B and *N. ispahanica L.* leaf extract treatments were 18.5 and 2989.5 μg mL^{-1} on *L. major* promastigotes, respectively. The results of a study indicated that there was a relationship between phenolic compounds antimicrobial effect of plant extracts also the antifungal and antioxidant effects of the ethanolic extract of lemon balm. The results of this study showed that the tested extracts had a high antimicrobial effect and attributed this effect to the high concentration of caryophyllene and caryophyllene oxide. They also stated that the chemical compounds of the extracts, such as monoterpene hydrocarbons, have a visible protective effect. A study showed that the best concentration of *N. ispahanica L.* essential oil in terms of inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and producing cheese with desirable flavor properties was 0.015% in combination with probiotic bacteria. Also, the mentioned essential oil had the highest effect on the growth of *S. aureus* at two concentrations, 0.015 and 0.03% respectively, and in combination with probiotics, it significantly prevented the count of these bacteria from reaching its toxic dose in the studied product. Also, increasing the concentration of essential oil was significantly effective in reducing the number of *S. aureus* ($P \leq 0.05$). The highest compound present in the *N. ispahanica L.* essential oil studied was pulgone. The antimicrobial effects of pulgone have been reported in previous studies. In another study, it was shown that *N. ispahanica L.* essential oil has very high antimicrobial power, so it can be used in combination with other preservatives to protect food against microorganisms that cause infection and poisoning. Also, chemical analysis of *N. ispahanica L.* essential oil led to the identification of 22

compounds with a total of 95.3%. Polugone (31.54%), 1-8 cineole (15.89%), menthofuran (11.8%), and cis-isopulgone (9.74%) were the major compounds of the essential oil. The minimum inhibitory concentration of *S. aureus* bacteria was in the range of 75 to 1200 µg mL^{-1}. A study was shown that the presence of ethanolic propolis extract alone in the initial formulation of polylactic acid films was not effective against four foodborne pathogens studied, while the addition of this compound to films containing *N. ispahanica* essential oil increased the effective antibacterial properties of the resulting films. As a result, the simultaneous use of these two compounds in the structure of hydrophobic films, such as polylactic acid film, is recommended for the production of active food packaging films. The anti-leishmanial effect of green tea plant extract on promastigotes of *L. major* and *L. infantum* parasites using the MTT colorimetric method has an efficiency equivalent to that of glucantim. Another study has shown a significant anti-leishmanial effect of extracts of *Artemisia angustifolia* and cotton boll on *L. major* promastigotes. Extracts of Shirazi thyme, *Peganum harmala*, and *Myrtus communis* were also investigated *in vitro* by the colorimetric method and showed relative effectiveness.

Conclusions

The results showed an increase in dose-dependent apoptosis based on flow cytometric analysis. Also, the proximity of *N. ispahanica L*. leaf extract and amphotericin B treatments in apoptosis-like cell death, which increases with increasing drug concentration. According to the IC50 results of *N. ispahanica L* leaf extract and its high apoptotic efficiency, further studies are needed to evaluate of *N. ispahanica L.* leaf extract on *Leishmania* parasite and also, to design a clinical setting for this herbal drug.

Author Contributions

Conceptualization: S. G. R., & S. I.; Methodology: N. A. I., S. G. R., & S. I.; Software: N. A. I., S. G. R., & S. I.; Formal analysis: S. G. R.; Investigation: N. A. I., & S. I.; Writing-original draft preparation: S. G. R.; Writing-review and editing: S. G. R.; Visualization: S. G. R., & S. I.; Funding acquisition: N. A. I., S. G. R., & S. I. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

The data supporting this study's findings are not publicly available, but are available from the corresponding author upon reasonable request, subject to approval by the relevant institutional review board.

Acknowledgements

The authors thank all Universities, including: University of Hormozgan, Kerman University of Medical Sciences, and Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, which helped us in this study.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the University of Hormozgan, Iran, and Kerman Medical University, Iran.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

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

بررسی اثر عصاره الکلی برگ پونه کوهی بر روی مرحله پروماستیگوت لیشمانیا ماژور با روش رنگ‌سنجی در مدل برون‌تنی

ایمان نیک آیین

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران و دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: nikan9293@gmail.com

غلامرضا شریفی

*نویسنده مسئول: هیات‌علمی، گروه مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: sharifi@uk.ac.ir

ایرج شریفی

هیات‌علمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: iraj.sharifi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۳

چکیده

هدف: لیشمانیوز یکی از بیماری‌های انگلی است که به‌طور گسترده در جهان توسط تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد شده‌است. در حال حاضر جهت درمان لیشمانیوز جلدی از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان نظیر گلوکانتیم و آمفوتریسین B استفاده می شود. داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هرگونه عارضه هستند و از طرفی دردسترس 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 پونه، روی مرحله پروماستیگوت لیشمانیا ماژور با روش رنگ سنجی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. برای تعیین سمیت عصاره بر سلول‌های ماکروفاژ از روش MTT و خوانش با الایزا و برای تعیین اثر آنتی پروماستیگوتی عصاره از روش بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری استفاده شد. میزان CC_{50} و IC_{50} از طریق نتایج این دو تست محاسبه شدند و در هر دو تست از آمفوتریسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای این منظور، پروماستیگوت‌ها به همراه غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه دارویی پونه و آمفوتریسین B بر روی پلیت ۹۶ خانه اضافه و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس ارزیابی‌ها براساس آزمون‌های

فوق صورت پذیرفت. داده‌های آماری با استفاده از روش دانکن، ANOVA و نرم افزار SAS در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) آنالیز شدند.

نتایج: بیشترین مقدار آپوپتوز مربوط به تیمار۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که به‌ترتیب در آمفوتریسین B ۹۷/۳۵ درصد و در عصاره الکلی برگ گیاه دارویی پونه ۴۷/۴۲ درصد بود. غلظتی از دارو که از رشد ٪۵۰ سلول‌ها جلوگیری می‌کند (CC_{50})، برای آمفوتریسین B ۱۲۹/۶ و برای عصاره گیاه دارویی پونه ۱۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. میزان IC_{50} پروماستیگوت در آمفوتریسین و عصاره گیاه دارویی پونه به‌ترتیب به‌طور میانگین ۱۸/۵ و ۱۱۱/۰۱ ± ۲۹۸۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی برگ گیاه پونه با افزایش غلظت از رشد پروماستیگوت‌ها جلوگیری کرده و در بعضی از غلظت‌ها با یکدیگر و با داروی آمفوتریسین B تفاوت معنی‌داری داشتند. براساس نتایج فلوسایتومتری، افزایش آپوپتوزیس وابسته به دوز دیده‌شد. با توجه به نتایج CC_{50} عصاره الکلی برگ گیاه پونه، اثر بخشی بالایی نشان‌داد. لذا مطالعات بیشتر برای ارزیابی تاثیر آن بر روی انگل لیشمانیا در شرایط بالینی بسیار مطلوب است.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوزیس، آمفوتریسین B، پونه، روش رنگ‌سنجی، لیشمانیا ماژور

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: نیک آئین ایمان، شریفی غلامرضا، شریفی ایرج (۱۴۰۴). بررسی اثر عصاره الکلی برگ پونه کوهی بر روی مرحله پروماستیگوت لیشمانیا ماژور با روش رنگ‌سنجی در مدل برون‌تنی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۴)، ۵۱-۷۰.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شود که توسط تک‌یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود (Markell et al., 2006). این بیماری یکی از بیماری‌های مهم انگلی در دنیا محسوب می‌شود که در مرکز تحقیقات بیماری‌های گرمسیری دنیا جز سه بیماری اول (تریپانوز و میازیس آفریقایی، تب دانگ، لیشمانیوز) طبقه‌بندی شده‌است (Desjeux, 2001; Desjeux, 2004; Fard et al., 2003). لیشمانیوز یکی از معضلات بهداشتی جهان به خصوص در کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری به‌شمار می‌آید (Mohebali et al., 2004). 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 برای درمان بیماری‌های رایج آن منطقه، مورد تاکید قرار می‌دهد (Lamidi et al., 2005). برخی محصولات طبیعی، نظیر عصاره گیاهان تیره فلفل سیاهیان ((Piperaceae) *Sarcorhachis naranjoana*)، به عنوان منبع غنی از ترکیبات ضد لیشمانیایی محسوب

می‌شوند (Bouvier et al., 1987; Williams et al., 2003). نتایج یک مطالعه اثر ضد لیشمانیایی گیاه اسطوخودوس را نشان داد که سرعت تکثیر پروماستیگوت‌ها پس از افزودن اسانس گیاه به میزان قابل توجهی نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵) (Bonyadian et al., 2015). در مطالعه دیگری تاثیر عصاره‌های آبی دو گیاه درمنه و تشنه‌داری بر رشد لیشمانیا ماژور نشان داد که پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI-1640 تحت تاثیر غلظت‌های ٪ ۲۰ و ٪۲۵ عصاره درمنه، در همان روز اول به طور کامل از بین رفتند. در حالی که تشنه‌داری در غلظت عصاره٪۲۵ و در روز سوم باعث مرگ انگل شد (Dalimi et al., 2013). با بررسی فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره‌های درخت زیتون، نشان داده شد که هیدروکسی تیروزول بیشترین اثر ضد لیشمانیایی را بر علیه پروماستیگوت‌های مرحله رشدی ثابت و لگاریتمی لیشمانیا ماژور در میان همه ترکیبات طبیعی آزمایش‌شده 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، اگرچه تفاوت معنی‌داری نداشتند. عصاره‌ها در مقایسه با داروی کنترل (شاهد)، اثر کمتری داشتند (Nosratabadi et al., 2015). در مطالعه دیگر با بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد، با روش رنگ‌سنجی به صورت برون‌تنی (*In vitro*) دریافتند، اگر چه داروی تارتارامتیک در مقایسه با این عصاره‌ها تاثیر بیشتری داشت. اما، همه این عصاره‌ها بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور تاثیر قابل ملاحظه‌ای نشان‌دادند (Barati et al., 2010). این تحقیق به منظور بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره الکلی برگ پونه (*Nepeta ispahanica*) بر روی لیشمانیا ماژور با استفاده از روش رنگ‌سنجی انجام شد. از اهداف این تحقیق می توان به موارد ذیل اشاره نمود. آیا عصاره گیاه دارویی پونه خاصیت ضد لیشمانیایی دارد. اگر این خاصیت در عصاره این گیاه وجود دارد این اثر در مقایسه با داروی‌های شیمیایی مورد استفاده رایج در پزشکی برعلیه لیشمانیا مثل آمفوتریسین B چگونه است و اینکه درصد بازدارندگی و کشندگی آن بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا چقدر است.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری: برگ‌های گیاه پونه از توده بومی پونه در روستای سیرچ واقع در شهرستان کرمان، استان کرمان، کشور ایران 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 به وسیله 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 (Jamshidi et al., 2014).

کشت سویه استاندارد انگل لیشمانیا: 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 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 شدند. حرکات انگل در نمونه‌ای از آنها در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت که نمونه های دارای حرکات انگل زنده محسوب شدند. کشت‌ها هر روز در زیر میکروسکوپ معکوس (Invert) آزمایش شدند و چنانچه تا ۷۲ ساعت انگل زنده‌ای وجود نداشت، یک پاساژ به‌منظور حذف بقایای احتمالی مواد نگهداری شده، انجام شد. 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 رشد انگل با میکروسکوپ معکوس بررسی شد. هر روز بالام نئوبار تعداد انگل شمارش شد؛ به این ترتیب که ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط حاوی انگل برداشت و با ۱۰۰ میکرو لیتر از رنگ تریپان بلو مخلوط شد، یک قطره برداشته شد و با لام نئوبار در یکی از خانه‌های شانزده تایی شمارش شد و با استفاده از فرمول زیر تعداد تقریبی انگل در هر میلی لیتر محاسبه شد (Khademvatan et al., 2011):

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

تست MTT و بررسی میزان سمیت: 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 جهت شروع آزمایش قابل قبول 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 پونه) به‌میزان ۱۰ میکرولیتر اضافه‌شد. در سه خانه‌ی اول پلیت به جای دارو، محیط کشت اضافه و به‌عنوان کنترل استفاده‌شدند. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها 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 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد. سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه شیکر شدند تا به‌طور کامل مخلوط شوند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت درون انکوباتور بازگردانده و نگهداری شدند و پس از طی این زمان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آن‌ها افزوده شد و بلافاصله میزان جذب نوری آن‌ها، با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد (Yousefi et al., 2014).

تعیین میزان آپوپتوزیز با فلوسایتومتری: 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 بر میلی‌لیتر آمفوتریسین B و عصاره

الکلی برگ پونه به میکروتیوب‌های استریل مخصوص خود افزوده‌شد. دو تا از میکروتیوب‌ها به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته‌شدند و به آن‌ها فقط همان تعداد انگل اضافه‌شد و سپس حجم کل واکنش با استفاده از محیط کشت RPMI- 1640 به‌همراه ۱۰ درصد FBSبه یک سی‌سی رسانده‌شد. سپس تمامی میکروتیوب‌ها به انکوباتور ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. پس‌از طی این زمان، میکروتیوب‌ها با دور rpm ۱۴۰۰۰ و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعداز سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد و رسوب تحتانی همه میکرتیوب‌ها به‌وسیله محلول PBS [1] سه مرتبه شستشو داده‌شد. سپس به رسوبی که سه مرتبه شستشو داده‌شده‌بود، 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 شدند (Allahdin et al., 2014).

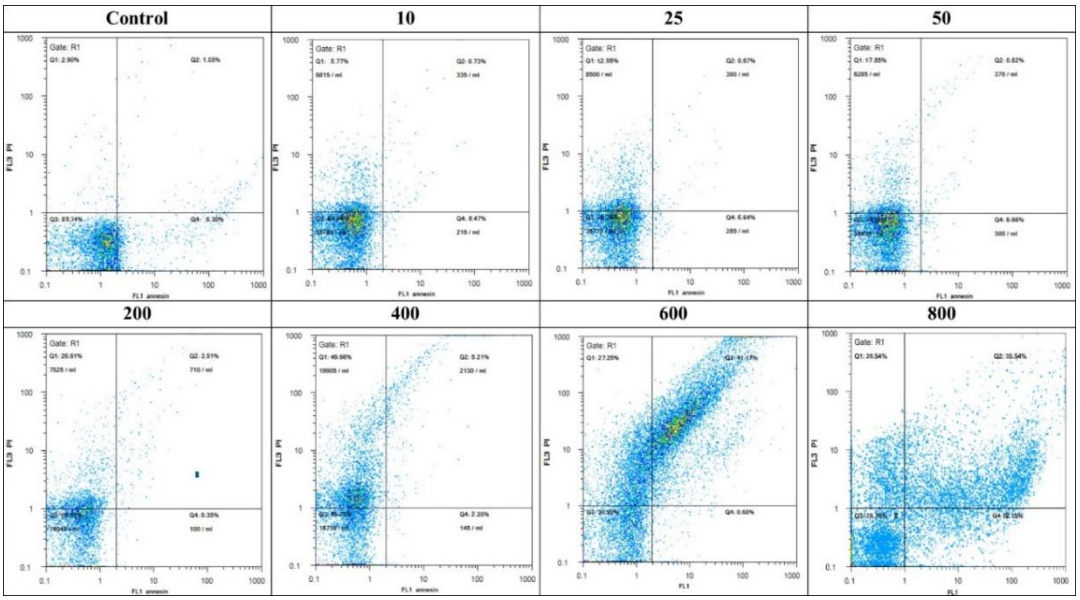
سنجش میزان سمیت دارو: ماکروفاژهای J774-A.1 موشی تهیه‌شده از انستیتو پاستور ایران در محیط کشت RPMI1640 کشت و تکثیر شدند (درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۸ درصد بود که قابل قبول جهت شروع آزمایش بود). برای سنجش میزان سمیت دارو، در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ۹۰ میکرولیتر از سلول‌های ماکروفاژ موشی J774-A.1 که حاوی ۱۰ هزار سلول است ریخته‌شد و به هر یک از آن‌ها به‌صورت تکرارهای سه‌تایی و به‌ترتیب غلظت‌های مختلف داروها (آمفوتریسینB و عصاره الکلی برگ پونه) به‌میزان ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. در سه خانه‌ی اول پلیت به جای دارو، محیط کشت اضافه و به‌عنوان کنترل استفاده‌شدند. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه‌شدند. سپس پلیت‌ها از انکوباتور خارج شدند و در زیر هود و در کنار شعله (شرایط استریل) مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که قبلاً تهیه شده بود 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 شوند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت درون انکوباتور بازگردانده‌شدند 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 قرائت شدند (Allahdin et al., 2014).

آنالیز آماری: داده‌های آماری با استفاده از طرح آزمایشی یک طرفه (کاملاً تصادفی) آنالیز شدند. با توجه به معنی‌دار شدن اثر تیمارها، مقایسه میانگین ها با استفاده از روش دانکن و نرم افزار SAS در سطح احتمال P≤۰/۰۵ انجام شد.

1. phosphate buffered saline

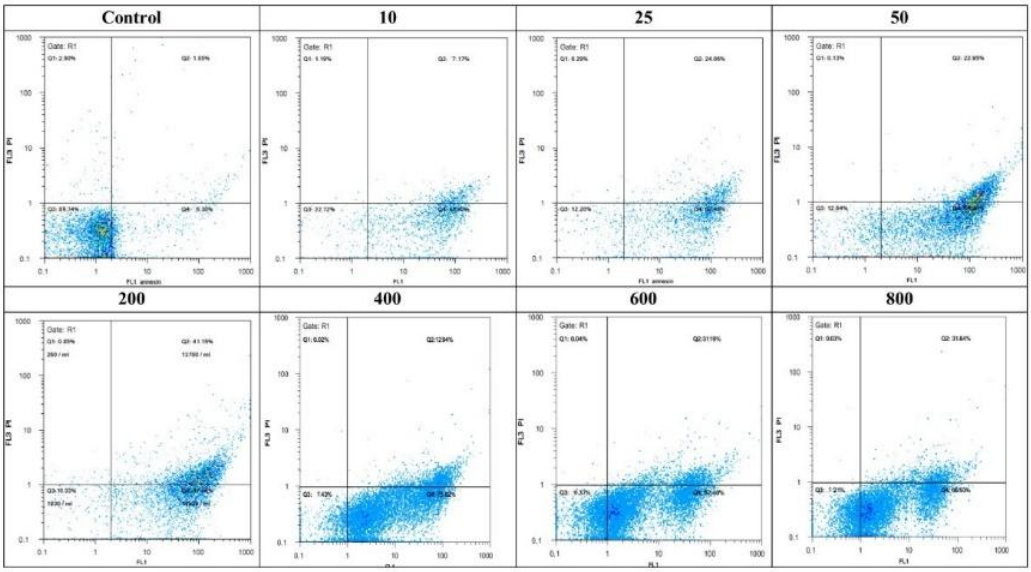
نتایج و بحث

نتایج این بررسی نشان داد که بر اثر مجاورت دارو و انگل، پروماستیگوت‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوزیس می‌شوند که درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با توجه به غلظت‌های دارویی رو به افزایش است، تیمارهای غلظتی پایین‌تر از ۴۰۰ با تیمارهای ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ گیاه پونه سبب اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد $P\leq0/05$ در میزان آپوپتوزیس پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور شدند (شکل ۱ و جدول ۱). عصاره الکلی برگ‌های پونه در غلظت‌های ۸۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان آپوپتوز در بین غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگی پونه را داشتند و در کلاس‌های k و l قرار گرفتند (شکل ۱ و جدول ۱). میزان آپوپتوز تیمار شاهد تقریباً ۷ درصد می‌باشد. از غلظت ۱۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریپسین B میزان آپوپتوزیس رو به افزایش بود و اختلاف تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد ($P\leq۰/۰۵$) معنی‌دار بود و غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد ($P\leq۰/۰۵$) نداشتند (شکل ۲ و جدول ۱). آمفوتریپسین B در غلظت‌های ۸۰۰، ۶۰۰، و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان آپوپتوز را سبب شد و این تیمارهای دارویی شیمیایی به‌ترتیب در کلاس‌های a، b، و c قرار گرفتند (شکل ۲ و جدول ۱).



شکل ۱. نتایج فلوسایتومتری آپوپتوز پروماستیگوت لیشمانیا ماژور بر اثر غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۲۰۰، ٤٠٠، ٦٠٠، ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ‌های پونه و کنترل

Figure 1. The flow cytometric results of treated apoptotic promastigote cells of *Leishmania major* by different concentrations 10, 25, 50, 200, 400, 600, 800 µg/mL of alcoholic extract of leaves of *Nepeta ispahanica* and control



شکل ۲. نتایج فلوسایتومتری آپوپتوز پروماستیگوت لیشمانیا ماژور بر اثر غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریسین B و کنترل

Figure 2. The flow cytometric results of treated apoptotic promastigote cells of *Leishmania major* by different concentrations of 10, 25, 50, 200, 400, 600, 800 µg/mL of amphotericin B, and control

سیتوتوکسیستی تیمارها در مقایسه با هم به منظور بررسی سمیت و اثر سایتو توکسیسیتی داروها: در این مطالعه، از روش رنگ‌سنجی استفاده شد و نتایج به‌این صورت بودند که غلظتی از دارو که از رشد ٪ ۵۰ سلول‌ها جلوگیری می‌کند (CC_{50})، برای آمفوتریسین B برابر ۱۲۹/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر ، برای پونه ۱۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین میزان IC_{50} پروماستیگوت یعنی میزانی از دارو که باعث از بین رفتن ٪۵۰ از انگل‌های می‌شود، برای آمفوتریسین B و پونه به ترتیب برابر با ۱۸/۵ و ۲۹۸۹/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است. شاخص بین المللی SI برای آمفوتریسین B و پونه به ترتیب برابر با ۷ و ۰/۰۵ است (جدول ۲). عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده‌ی آنها احتمالاً منابع غنی از عوامل دارویی جدید را فراهم می‌کنند (Bouvier et al., 1987; Mishra et al., 2009). مکانیسم عمده و اصلی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی، تخریب دیواره سلولی و آسیب به غشا سیتوپلاسمی و پروتئین‌های غشایی، کوآگولاسیون سیتوپلاسم و نشت محتوای درون سلولی و در نتیجه مرگ سلول باکتری توسط ترکیبات فنولی بیان شده‌است (Takó et al., 2020). عصاره الکلی برگ پونه و داروی آمفوتریسین B هر دو رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را در شرایط آزمایشگاهی مهارکردند. میزان IC_{50} آمفوتریسین در پروماستیگوت به طور میانگین ۱۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در عصاره گیاه پونه ۲۹۸۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد، بیشترین میزان آپوپتوزیس (حضور فسفاتیدیل سرین بر سطح غشای سلولی) مربوط به گیاه پونه کوهی، در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

۴۷/۴۲ درصد می‌باشد. میزان آپوپتوز در داوری کنترل (آمفوتریسین B) در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۹۷/۳۵ درصد می‌باشد. نتایج آزمایشات نیک‌آیین و همگاران با استفاده از عصاره الکلی برگ گیاه برگ‌بو مشخص نمود که 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 داشت و بر اساس نتایج فلوسایتومتری، افزایش آپوپتوزیس وابسته به دوز دیده‌شد. بیشترین مقدار آپوپتوز مربوط به تیمار۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که به‌ترتیب در آمفوتریسین B ۹۷/۳۵ و عصاره برگ‌بو ۶۳/۰۴ درصد بود. غلظتی از دارو که از رشد ٪۵۰ سلول‌ها جلوگیری می‌کند (Nik Aien et al., 2020).

جدول ۱. مقایسات میانگین نتایج آپوپتوز غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ٦۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریسین B ، عصاره الکلی برگ پونه و کنترل بر سلول‌های پروماستیگوت لیشمانیا ماژور

Table 1. Mean comparison of apoptosis results of different concentrations 10, 25, 50, 200, 400, 600, 800 µg/mL of amphotericin B, *Nepeta ispahanica* alcoholic extract and control on promastigote cells of *Leishmania major*

معنی داری (P≤0/05) Significance	درصد آپوپتوزیس Apoptosis concentration	غلظت (µg/mL) Concentration	تیمار Treatment
F	76.21	10	آمفوتریسین B Amphotericin B
E	87.11	25	
E	87.45	50	
D	88.04	200	
C	92.40	400	
B	94.25	600	
A	97.35	800	
M	7.30	10	عصاره الکلی پونه *Nepeta ispahanica* alcoholic extract
M	7.39	25	
M	7.37	50	
M	7.42	200	
M	7.38	400	
L	41.11	600	
K	47.42	800	
M	۷.۰۱	–	شاهد (بدون دارو) Control

۱- حروف لاتین مشابه در ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار (p≤۰/۰۵) بین میانگین تیمارها می باشد

1- Synonym Latin words do not show significant difference between mean of treatments (P≤۰/۰۵)

جدول ۲. میزان IC_{50} ، CC_{50} و شاخص SI آمفوتریسین B و عصاره برگ‌های گیاه پونه روی سلول‌های پروماستیگوت لیشمانیا ماژور

Table 2. Amount of IC_{50}, CC_{50}, and SI index of amphotericin B and leaves extract of bay *Nepeta ispahanica* on promastigote cells of *Leishmania major*.

تیمارها Treatments	$IC50^a$ میانگین ± انحراف معیار Mean ± Standard deviation	$CC50^b$	SI^C
آمفوتریسین B Amphotericin B	18.5 ±0.22	129.6	7.00
عصاره الکلی پونه *Nepeta ispahanica* alcoholic extract	2989.5 ±111.01	162	0.05

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

a= Treatment concentration which kills 50 percentage from the promastigote cells of *Leishmania major*, b= Treatment concentration which limits growth of 50 percentage of the cells, c= Promastigote selective index (CC_{50}/IC_{50})

نتایج بررسی‌های Chen et al. (2024) نیز بیانگر این بود که بین ترکیبات فنولی با اثر ضد میکروبی گیاهان ارتباط وجود داشت (Chen et al., 2024). پژوهشگران دیگر نیز تاثیر ضد قارچی و آنتی اکسیدانی عصاره‌های اتانولی بادرنجبویه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌های مورد آزمایش، دارای اثر ضد باکتریایی بالایی هستند و این اثر را ناشی از غلظت بالای کریوفیلن و کاریوفیلن اکسید دانستند و همچنین بیان کردند که ترکیبات شیمیایی عصاره‌ها از قبیل هیدروکربن‌های مونوترپن اثر حفاظتی قابل مشاهده دارند (Yazdani et al., 2020). بررسی Mahmoudi et al. (2010) نشان داد بهترین غلظت اسانس پونه کوهی از نظر ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و نیز تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۰۱۵ درصد در تیمار توام با باکتری پروبیوتیک بود. همچنین اسانس مذکور در دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد به ترتیب از بالاترین تاثیر بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار بوده و در تیمار توام با پروبیوتیک به طور معنی‌داری از رسیدن شمارش این باکتری به دوز مسمومیت‌زایی خود در فرآورده مورد بررسی کاملاً جلوگیری کرد. همچنین افزایش غلظت اسانس به طور معنی‌داری برکاهش تعداد استافیلوکوکوس اورئوس موثر بود ($P\leq$۰/۰۵). بالاترین ترکیب موجود در اسانس پونه کوهی مورد مطالعه پولگون بود (Mahmoudi et al., 2010). اثرات ضد میکروبی پولگون در مطالعات قبلی گزارش شده‌است. همچنین Mahmoudi et al. (2011) در مطالعه دیگری نشان دادند اسانس پونه کوهی از توان ضد میکروبی بسیار بالایی برخوردار است، بنابراین می‌توان از آن

در ترکیب با سایر نگهدارنده‌ها جهت محافظت مواد غذایی در مقابل میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت استفاده نمود. همچنین آنالیز شیمیایی اسانس پونه کوهی منجر به شناسایی ۲۲ ترکیب با مجموع ۹۵/۳ درصد درآن شد. پولگون (۳۱/۵۴ درصد)، ۸-۱ سینئول (۱۵/۸۹ درصد)، منتوفوران (۱۱/۸ درصد) و سیس ایزوپولگون (۹/۷۴ درصد) ترکیب‌های عمده اسانس را تشکیل می‌دادند. حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محدوده ۷۵ تا ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت (Mahmoudi et al., 2011). در مطالعه‌ای Misaghi et al. (2018) نشان دادند حضور عصاره اتانولی بره‌موم به تنهایی در فرمولاسیون اولیه فیلم‌های پلی‌لاکتیک‌اسید علیه چهار پاتوژن غذا زاد مورد مطالعه، تاثیر گذار نبوده در حالی که اضافه‌شدن این ترکیب به فیلم‌های حاوی اسانس پونه کوهی موجب افزایش ویژگی‌های موثر ضد باکتریایی فیلم‌های حاصل شد. در نتیجه استفاده همزمان از این دو ترکیب در ساختار فیلم‌های آبگریز مانند فیلم پلی‌لاکتیک‌اسید برای تولید فیلم‌های فعال بسته‌بندی مواد غذایی توصیه می‌شود (Misaghi et al., 2018). اثر ضد لیشمانیایی عصاره گیاه چای سبز بر پروماستیگوت انگل‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم با روش رنگ‌سنجی MTT دارای اثربخشی معادل گلوکانتیم می‌باشد (Weigle et al., 1991). تحقیق دیگری اثر قابل ملاحظه ضد لیشمانیایی عصاره‌های درمنه کوهی، آنقوزه و قوزه پنبه بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را نشان داده است. عصاره گیاه آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ‌سنجی به صورت برون تنی نیز توسط Barati et al. (2014) بررسی شده‌است و اثر بخشی نسبی نشان داد (Barati et al., 2014).

نتیجه‌گیری: نتایج فلوسایتومتری انجام شده در این مطالعه نشان می‌دهد که با افزایش غلظت دارو، افزایش تاثیر بر ارگانیسم اتفاق می‌افتد، در غلظت‌های بالاتر این تاثیر قابل ملاحظه می‌باشد. که احتمالا بدلیل دوز بیشتر بکار رفته از ترکیبات موثر ضد انگلی موجود در عصاره‌ها می باشد. اگر چه داروی آمفوتریسین B در مقایسه با عصاره پونه تاثیر بیشتری نشان داد اما عصاره این گیاه بر فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژرو تاثیر قابل ملاحظه‌ای نشان داد. لذا مطالعات بیشتری برای ارزیابی تاثیر آن بر روی انگل لیشمانیا در شرایط بالینی بسیار مطلوب است.

سپاسگزاری: نویسندگان بر خود وظیفه می‌دانند از دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان و دانشگاه هرمزگان بخاطر فراهم نمودن شرایط لازم جهت انجام این آزمایش تشکر و تقدیر نمایند.

منابع

الله‌دین سودابه، خادم‌وطن شهرام، هاشمی‌تبار محمود، اسکندری البرز (۱۳۹۳) بررسی تاثیر عصاره گیاه کاملیا ساینسیس بر پروماستیگوت انگل‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم با روش رنگ سنجی MTT. مجله مطالعات علوم پزشکی ارومیه ۲۵(۱۰)، ۹۰۰-۸۹۳.

براتی محمد، شریفی یاور، شریفی فر فاطمه (۱۳۸۸) بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره‌های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ‌سنجی به صورت برون‌تنی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۱۷، ۴۱-۳۲.

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

دلیمی عبدالحسین، اربابی محسن، ناصری فر راضی (۱۳۹۲) بررسی تاثیر عصاره آبی دو گیاه *Artemisia sieberi* Besser و*Scrophularia striata* Boiss بر رشد لیشمانیا ماژور در شرایط *In vitro*. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۹، ۲۳۷-۲۴۶. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2013.2904

صدوقی مرتضی (۱۳۹۵) ارزیابی فعالیت ضد لیشمانیایی عصاره چای سبز بر روی پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا تروپیکا در شرایط برون‌تنی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ص. ۱۲۰-۱.

محمودی رزاق، احسانی پهرآباد علی، تاچیک حسین و همکاران (۱۳۸۹) اثر ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و لاکتوباسیلوس کازئی بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سفید ایرانی. مجله پژوهش های صنایع غذایی۲۰ ، ۱۶۱-۱۴۷.

محمودی رزاق، تاچیک حسین، فرشید امیر عباس و همکاران (۱۳۹۰) تعیین ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس پونه کوهی علیه باکتری استافیلو کوکوس اورئوس. ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ۱۶، ۴۱۲-۴۰۰.

میثاقی علی، سعیدی معصومه، نوری نگین، رضایی گلستانی محمدرضا (۱۳۹۷) مطالعه تاثیر اسانس پونه کوهی و عصاره اتانولی بره موم بر ویژگی های ضد باکتریایی و برخی ویژگی های فیزیکی فیلم های زیست تخریب پذیر پلی لاکتیک اسید. مجله سلامت و محیط زیست، فصلنامه علمی پژوهشی انجمن علمی بهداشت محیط ایران۱۱، ۱۲۲-۱۱۱.

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. https://doi.org/10.22103/jab.2021.16918.1282

یزدانی مرتضی، جوکار کاشی فرشته، طلوعی زینب، رحیمی مقدم اکرم (۱۳۹۹) ارزیابی فیتوشیمیایی سمیت سلولی، آنتیاکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس گیاه دارویی *Melissa officinalis* L. در منطقه مریوان. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی ۲۹، ۳۰-۱۶.

References

Allahdin, S., Khademvatan, S., Hashemitabar, M., & Eskandari, A. (2014). *In vitro* activity of *Camellia sinensis* extracts against *L. major* and *L. infantum* promastigotes using the Colorometric MTT Assay. *Journal of Medical Science Studies*, *25*(10), 893-900 (In Persian). https://umj.umsu.ac.ir/browse.php?a_id=2546&sid=1&slc_lang=en

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). https://www.sid.ir/paper/146/en

Barati, M., Sharifi, I., Sharififar, F. Hakimi Parizi, M., & Shokri, A. (2014). Antileishmanial Activity of *Gossypium hirsutum* L., *Ferula assa-foetida* L. and *Artemisia aucheri* Boiss. Extracts by Colorimetric Assay. *Anti-infective Agents*, *12*, 159-164. https://doi.org/10.2174/22113525113119990005.

Bonyadian, M., Hejazi, H., Azizi, H., Habibian, S., & Sayahi, A. (2015). Antileishmania activity of *Levandula officinalis* essence against *Leishmania major* in *in vitro* media. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, *17*, 93- 101 (In Persian).

Bouvier, J., Etges, R., & Bordier, C. (1987). Identification of the promastigote surface protease in seven species of leishmania. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *24*, 9-73. https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90117-4.

Chen, X., Lan, W., & Xie, J. (2024). Natural phenolic compounds: Antimicrobial properties, antimicrobial mechanisms, and potential utilization in the preservation of aquatic products. *Food Chemistry*, *440*, 138-198. https://doi.org/10.1016/j.food chem.2023.138198

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 Research*, *29*, 237-246 (In Persian). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2013.2904.

Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *95*, 239-243. DOI: 10.1016/s0035-9203(01)90223-8.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, *27*, 305-318. http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004.

Fard, M. D, Kalantari, M., Rassi, Y., & Javadian, E. (2003). The PCR- based detection of *Leishmania major* infection in Meriones libycus (Rodentia: Muridae) from southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *97*, 811-816. https://doi.org/10.1179/000349803225002651.

Jamshidi, M., Shabani, E., Hashemi, Z., & Ebrahimzadeh, M. (2014). Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). *International Food Research Journal*, *21*(2), 783 -788. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20143367152

Khademvatan, S, Saki, J., Gharavi, M.J., & Rahim, F. (2011). *Allium sativum* extract induces apoptosis in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) promastigotes. *Journal of Medicinal Plant Research,* 5(16), 3725-32.

Kyriazis, J., Aligiannis, N., Polychronopoulos, P., Skaltsounis, A. L., & Dotsika, E. (2013). Leishmanicidal activity assessment of Olive tree extracts. *Phytomedicine*, 20, 275-281. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.11.013.

Lamidi, M., DiGiorgio, C., Delmas, F., Favel, A., Eyele Mve-Mba, C., Rondi, M. L., Ollivier, E., Nze-Ekekang, L., & Balansard, G. (2005). *In vitro* cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 90- 185. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.011.

Mahmoudi, R., Ehsani, A., Tajik., H., & Akhondzade Bast, A. (2010). Antimicrobial effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus aureus* in Iranian white cheese. *Journal of Medicinal Plants*, 20, 147-161 (In Persian).

Mahmoudi, R., Tajik, H., Farshid, A. A., Ehsani, A., Zaree, P., & Moradi, m. (2011). Phytochemical properties of *Mentha longifolia* L. essential oil and its antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*. *Armaghan-e-Danesh*, 16, 400-412 (In Persian). http://armaghanj.yums.ac.ir/article-1-307-en.html.

Markell, E. K., Voge, M. A., & John, D.T. (2006). Medical parasitology (7th ed.) W. B. Saunders Company Philadelphia, 148-159.

Misaghi, A., Saeedi, M., Noori, N., & Rezaeigolestani, M. (2018). Study of effect of oregano essential oil and ethanolic extract of propolis on antibacterial properties and some physical characteristics of biodegradable poly-lactic acid films. *Iranian Journal of Health and Environment*, 11, 111-122 (In Persian).

Mishra, B. B., Singh, R.K., Srivastava., A., Tripathi, V. J., & Tiwari, V. K. (2009). Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *9*, 107123. https://doi.org/10.2174/138955709787001758

Mohebali, M., Taran, M., & Zarei, Z. (2004). Rapid detection of *leishmania infantum* infection dogs: Comparative study using an immune chromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. Veterinary Parasitology, *121*, 239-245. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.02.014.

Nik Aien, I., Sharifi-Sirchi, G. h., & Sharifi, I. (2020). 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 (In Persian). https://doi.org/10.22103/JAB.2021.16918.1282.

Nosratabadi, S.J., 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*. *Journal of Parasitic Diseases*, *39*, 18-21. https://doi.org/10.1007/s12639-013-0377-3.

Sadughi, M. (2018). Evaluation Leishnrunicidal activity of Green Tea extract (Epigullocatechin 3- O - Gallotel on *Leishmonia tropica* promastigote and antastigote *in vitro*. MSc thesis, *Kerman Universitv of Medical Sciences*, pp. 1-120.

Takó M, Kerekes EB, Zambrano C Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., & Vágvölgyi, C. (2020). Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. *Antioxidants (Basel)*, 18, *9*(2),165-186. https://doi.org/10.3390/antiox9020165.

Weigle, K.A., Valderrama, L., Arias, A. L., Santrich, C., & Saravia N. G. (1991). Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *44*, 260-271. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.260.

Yazdani, M., Jookar Kashi, F., Toluei, Z., & Rahimi-Moghaddam, A. (2020). Evaluation of phytochemical, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. from Marivan region. *Ecophytochemistry journal of Medicinal Plants*, *29*, 16-30 (In Persian).

Yousefi, E., Eskandari, A., Gharavi, M. J., & Khademvatan, S. (2014). *In vitro* activity and cytotoxicity of *Crocus sativus* extract against *leihmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Infectious Disorders Drug Targets*, *14*(1), 56-60. https://doi.org/10.2174/1871526514666140827101901.