مقاله پژوهشی

بررسی آزمایشگاهی تاثیر ضد لیشمانیایی اسانس زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) در مقایسه با داروهای رایج بر رشد اماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور*

سعید نظارتی زاده[1]، فهام خامسی پور[2]*، سید حسین حجازی[3]

۱. دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

***نویسنده مسئول:** faham.khamesipour@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۹/۱۳

چکیده

لیشمانیوز، یک بیماری انگلی مشترک بین انسان و حیوان، به عنوان یک معضل بهداشت عمومی شناخته می‌شود. درمان‌های رایج مبتنی بر ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی با محدودیت‌ها و عوارض جانبی قابل توجهی همراه است که نیاز به یافتن جایگزین‌های درمانی موثر را برجسته می‌کند. داروهای گیاهی منابعی امیدبخش برای تولید ترکیبات درمانی جدید هستند. هدف از این مطالعه، ارزیابی فعالیت ضد لیشمانیایی اسانس گیاه زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) بر فرم آماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور و مقایسه اثر آن با داروهای استاندارد بود. در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، پروماستیگوت‌های سویه استاندارد لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI-1640غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) کشت داده شدند. سپس ماکروفاژها به آماستیگوت‌های انگل آلوده شده و در معرض غلظت‌های مختلفی از اسانس زرین‌گیاه قرار گرفتند. داروی آمفوتریسین B به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از انکوباسیون، سمیت سلولی و میزان بقای آماستیگوت‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT ارزیابی و جذب نوری (OD) توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. در نهایت، شاخص غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد (IC50) برای اسانس و داروی کنترل محاسبه گردید. یافته‌ها نشان داد که اسانس زرین‌گیاه دارای اثر مهاری وابسته به دوز بر رشد آماستیگوت‌های درون‌سلولی است ($p<0.05$). غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد (IC50) اسانس علیه آماستیگوت‌ها ۱۱۳۶/۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد، در حالی که غلظت سمیت سلولی ۵۰ درصد (CC50) آن بر روی سلول‌های ماکروفاژ ۱۹۳/۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. اسانس زرین‌گیاه (*D. kotschyi*) پتانسیل قابل توجهی به عنوان یک عامل ضد لیشمانیا از خود نشان داد و توانست به طور موثری ماکروفاژهای آلوده به انگل را از بین ببرد. بنابراین، این ترکیب گیاهی می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مطالعات تکمیلی *in vivo* جهت تولید داروهای موضعی برای درمان لیشمانیوز جلدی (سالک) باشد.

کلمات کلیدی: *لیشمانیا ماژور*، زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi*)، سمیت سلولی، MTT، IC50.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]

مقدمه

لیشمانیوز، یک بیماری انگلی جهانی است که توسط تک‌یاخته‌ای از جنس *Leishmania* ایجاد و توسط پشه‌خاکی ماده منتقل می‌شود و به عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) شناخته می‌شود. این انگل در بدن میزبان مهره‌دار به فرم درون‌سلولی آماستیگوت تکثیر یافته و طیف وسیعی از تظاهرات بالینی، از جمله لیشمانیوز جلدی (CL) یا سالک را ایجاد می‌کند. لیشمانیوز جلدی که توسط *L. major* و *L. tropica* ایجاد می‌شود، شایع‌ترین شکل بیماری در ایران است که با وجود بهبودی خودبه‌خودی، اسکارهای دائمی و بدشکل به جای می‌گذارد (۱). درمان‌های رایج این بیماری، به‌ویژه ترکیبات آنتیموان پنج‌ظرفیتی و آمفوتریسینB، با چالش‌های جدی از جمله سمیت بالا بر ارگان‌های حیاتی، هزینه‌های سنگین، و ظهور و گسترش مقاومت دارویی مواجه هستند (۲). این محدودیت‌ها، نیاز فوری به تحقیق و توسعه داروهای جایگزین، ایمن‌تر و مؤثرتر را ضروری می‌سازد. در این راستا، گیاهان دارویی به عنوان منبعی غنی از ترکیبات فعال با پتانسیل ضد انگلی مورد توجه قرار گرفته‌اند. مطالعات متعدد، اثربخشی گیاهان بومی ایران را در درمان لیشمانیوز جلدی نشان داده است (۳).

یکی از این گیاهان دارویی ارزشمند، زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) است که در طب سنتی به دلیل خواص ضدمیکروبی و ضدالتهابی شناخته شده و حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی مانند ژرانیول و لیمونن می‌باشد (۴). با وجود خواص دارویی اثبات‌شده این گیاه، پتانسیل ضد لیشمانیایی آن تاکنون به صورت علمی ارزیابی نشده است. این شکاف مشخص در تحقیقات، پرسش اصلی این پژوهش را شکل می‌دهد. از این رو، مطالعه حاضر برای اولین بار با هدف ارزیابی فعالیت مهاری و سمیت سلولی اسانس *Dracocephalum kotschyi* بر رشد آماستیگوت‌های *Leishmania major* در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی-آزمایشگاهی (*In Vitro* Experimental Study) بود که در بازه زمانی ۳ ماهه در زمستان سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام پذیرفت. تمام مراحل این تحقیق پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق در پژوهش با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1400.034 صورت گرفت. اندام‌های هوایی گیاه زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi Boiss*) در مرحله گلدهی کامل از شهرستان فریدونشهر (استان اصفهان) جمع‌آوری و نمونه‌ای از آن با کد هرباریوم ۱۵۱۹ در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تایید و نگهداری شد. برای استخراج اسانس، ۱۲۰ گرم از پودر گیاه خشک‌شده تحت فرآیند تقطیر با بخار آب به وسیله دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت قرار گرفت. این فرآیند پنج بار تکرار و اسانس نهایی با سولفات سدیم بدون آب آبگیری و در ظروف شیشه‌ای تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۵). برای انجام آزمایش‌ها، یک محلول مادر از اسانس در حلال اتانول با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس، از این محلول مادر، رقت‌های نهایی مورد نیاز در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI-1640 آماده گردید. داروی آمفوتریسین B (AmBiosome, India) به عنوان کنترل مثبت در غلظت ۱۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر، که بر اساس مطالعات پیشین انتخاب شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. برای کنترل اثر احتمالی حلال، یک گروه کنترل جداگانه شامل غلظت متناظر اتانول بدون اسانس نیز در تمام آزمایش‌ها در نظر گرفته شد تا اثر سمی احتمالی اتانول بر سلول‌ها و انگل بررسی و از نتایج اصلی حذف گردد. سویه استاندارد *L. major* (MIRHO/IR/75/ER:کد) و رده سلولی ماکروفاژ موشی J774-A.1 (کد:C483) از منابع معتبر داخلی (گروه انگل‌شناسی دانشگاه اصفهان و انستیتو پاستور ایران) تهیه شدند. پروماستیگوت‌های انگل در محیط کشت دو فازی **NNN** و محیط کشت مایع RPMI-1640، (Gibco, Scotland, UK) غنی‌شده با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (FBS)، (Gibco, Scotland, UK) و

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]

آنتی‌بیوتیک‌ها، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و تکثیر شدند (۶). به منظور حفظ سویه برای مدت طولانی، از روش انجماد (cryopreservation) نیز استفاده گردید (۷). به منظور ارزیابی سمیت اسانس بر سلول میزبان، سلول‌های ماکروفاژ J774 (با تراکم ۲×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک) در پلیت ۹۶ خانه کشت و با غلظت‌های مختلف اسانس(۱۲۵ تا ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس، میزان بقای سلول‌ها با روش رنگ سنجی-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] MTT (Sigma-Aldrich, USA) سنجیده شد (۸). جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها با فرمول (جذب نوری نمونه / جذب نوری کنترل منفی) × ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظت سمیت سلولی ۵۰ درصد (CC50)، یعنی غلظتی که بقای سلول‌ها را به ۵۰ درصد کاهش می‌دهد، از طریق تحلیل رگرسیون غیرخطی داده‌ها محاسبه شد (۹). جهت تبدیل فرم پروماستیگوت به آماستیگوت، پروماستیگوت‌های *L. major* در فاز ایستا به نسبت ۱۰ انگل به ۱ ماکروفاژ با سلول‌های J774 کشت داده شدند. سپس، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کربن دی اکسید ۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا انگل‌ها درون ماکروفاژها تکثیر یافته و به فرم آماستیگوت درون‌سلولی تبدیل شوند. پس از این مرحله، محیط کشت برای حذف پروماستیگوت‌های آزاد شستشو داده شد و تیمار با اسانس آغاز گردید.سپس سلول‌های آلوده با غلظت‌های مختلف اسانس و داروی کنترل مثبت تیمار شدند. در این آزمایش از آمفوتریسینB، (AmBiosome, India) به عنوان کنترل مثبت و ماکروفاژهای آلوده بدون تیمار به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، اثربخشی به دو روش ارزیابی گردید. شمارش مستقیم: لام‌های درون چاهک‌ها با متانول غلیظ فیکس و با رنگ گیمسای ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰X)، میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در حداقل ۱۰۰ ماکروفاژ در هر نمونه شمارش شد. این بررسی سه بار تکرار گردید. سنجش بقا: آزمون MTT بر روی سلول‌های آلوده و تیمار شده انجام شد تا بقای کلی مجموعه سلول-انگل سنجیده شود. درصد مهار رشد با فرمول [۱ - (جذب نوری نمونه / جذب نوری کنترل منفی)] × ۱۰۰ محاسبه و غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد (IC50)از طریق تحلیل رگرسیون غیرخطی تعیین گردید (۱۰). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) از سه تکرار مستقل گزارش شدند. تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفت. پس از تایید نرمال بودن توزیع داده‌ها (آزمون کولموگروف-اسمیرنوف)، مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های مختلف با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) صورت گرفت. در موارد عدم توزیع نرمال، از آزمون کروسکال والیس استفاده شد (۱۱). برای مقایسه مستقیم میانگین نتایج دو گروه «سمیت سلولی» و «ضد انگلی» در غلظت‌های خاص (۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در گروه کنترل مثبت، از آزمون تی مستقل (Independent t-test) استفاده شد. در تمام آزمون‌ها، سطح معنی‌داری $p<۰.۰۵$ در نظر گرفته شد (۱۲).

نتـایج

در گام نخست، جهت بررسی تفاوت بین دوزهای مختلف اسانس و گروه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت، از آزمون ANOVA استفاده شد. نتایج این آزمون برای هر دو گروه «اماستیگوت + اسانس» و «ماکروفاژ + اسانس» معنادار بود؛ به‌عبارتی، میانگین پاسخ‌ها در دوزهای مختلف و گروه‌های کنترل با یکدیگر تفاوت معناداری داشتند. گروه کنترل اتانول تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل منفی (بدون تیمار) نشان نداد. به‌منظور شناسایی منشأ این تفاوت‌ها، آزمون تعقیبی توکی به‌کار گرفته شد که مقایسه زوجی بین گروه‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که در گروه «اماستیگوت + اسانس»، اختلاف معنی‌داری بین دوزهای ۲۰۰۰ ($p=۰.۰۱$) و ۱۰۰۰ ($p=۰.۳۴$) و همچنین گروه کنترل مثبت ($p=۰.۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل منفی وجود دارد. در گروه «ماکروفاژ + اسانس»، نتایج آزمون توکی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دوزهای ۲۰۰۰ ($p=۰.۰۳$)، ۱۰۰۰ ($p=۰.۰۳۳$) و گروه کنترل مثبت ($p=۰.۰۲۳$) در مقایسه با گروه کنترل منفی وجود دارد. نتیجه آزمون

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]

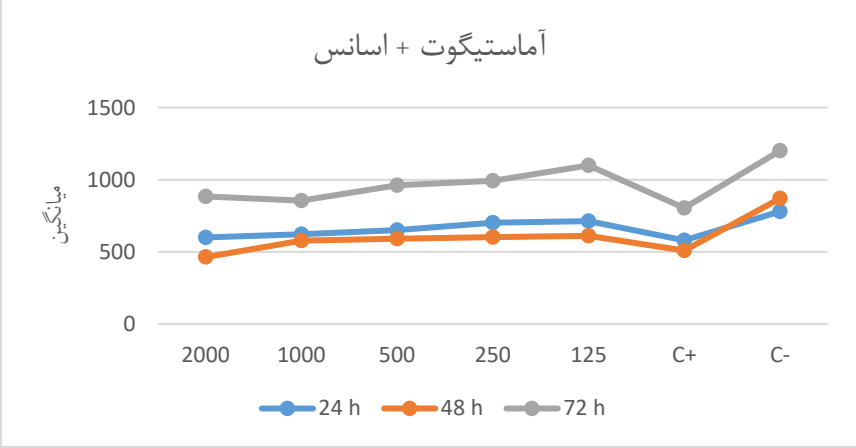
تی مستقل برای مقایسه دو گروه در دوزهای مختلف نشان داد که میانگین دو گروه «اماستیگوت + اسانس» و «ماکروفاژ + اسانس» از نظر دوز ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و گروه کنترل مثبت با هم تفاوت معنی‌دار دارند. به طوریکه میانگین در این دوزها در گروه «اماستیگوت + اسانس»به طور قابل توجهی بیشتر از گروه «ماکروفاژ + اسانس» بود (تصویر ۱).

تصویر ۱: نتیجه آزمون برای هر دو گروه اماستیگوت + اسانس و ماکروفاژ+ اسانس

* اختلاف بین دوزهای گروه ماکروفاژ+پروماستیگوت با گروه کنترل منفی در سطح ۰.۰۵

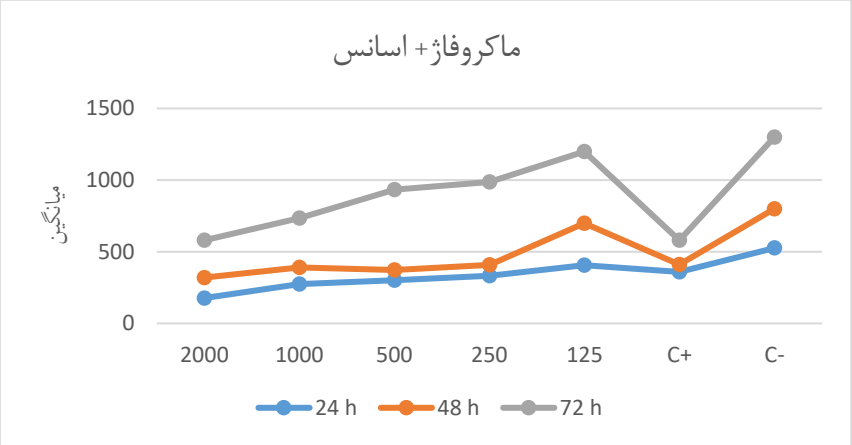
اختلاف بین دوزهای گروه ماکروفاژ+ اسانس با گروه کنترل منفی در سطح ۰.۰۵

نتیجه آزمون جهت بررسی اثر زمان یعنی تغییرات میانگین گروه‌ها در دوزهای مختلف در طول زمان برای هر دو گروه اماستیگوت + اسانس و ماکروفاژ+ اسانس معنی دار شد. همانطور که در تصویرهای شماره ۲ و ۳ مشخص است روند تغییرات میانگین در طول زمان برای همه دوزها افزایشی بوده است. همچنین نتیجه آزمون کروسکال واریس جهت بررسی میانگین دوزهای مختلف به طور جداگانه در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) برای هر دو گروه اماستیگوت + اسانس و ماکروفاژ+ اسانس معنی‌دار شد. همانطور که از تصویرهای شماره ۲ و ۳ مشخص است، در تمامی دوزها میانگین در طول زمان افزایش داشته به طوری‌که در زمان ۷۲ ساعت بیشترین مقدار را داشته است و گروه کنترل منفی نسبت به سایر دوزها میانگین بالاتری داشته است.



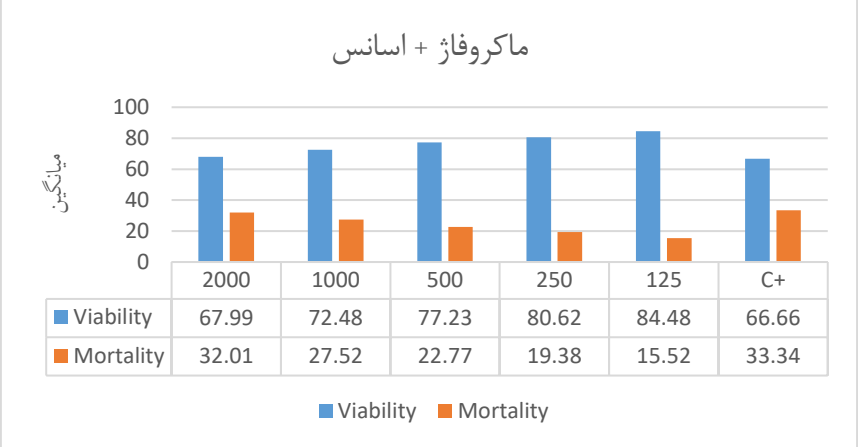
تصویر ۲: میانگین تعداد انگل کشته شده به تفکیک زمان و گروه مورد بررسی در گروه اماستیگوت + اسانس

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]



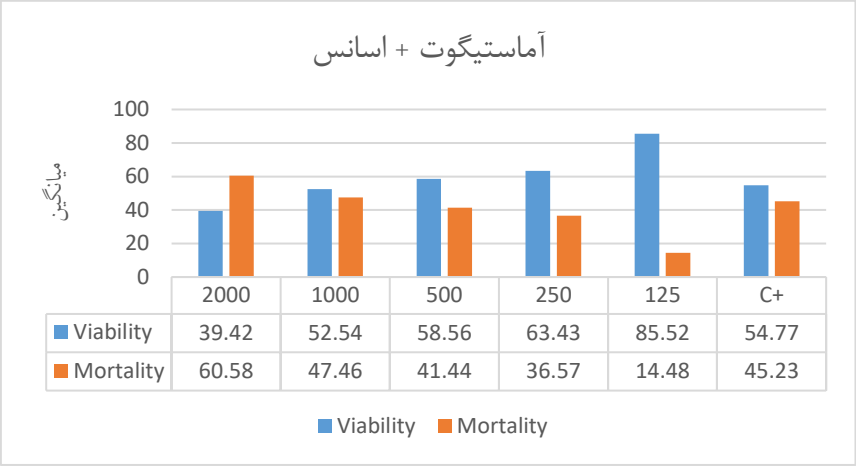
تصویر ۳: میانگین تعداد انگل کشت شده به تفکیک زمان و گروه مورد بررسی در گروه ماکروفاژ + اسانس

نتیجه آزمون جهت بررسی میانگین Viability و Mortality بین دوزهای مختلف اماستیگوت + اسانس و گروه کنترل مثبت معنی دار نشد. همانطورکه در تصویر ۴ آمده، میانگین Viability و Mortality در این گروه‌ها تقریبا یکسان می‌باشد. اما نتیجه آزمون برای مقایسه بین دوزهای مختلف ماکروفاژ اسانس و گروه کنترل مثبت برای هر دو Viability و Mortality معنی‌دار شد. بعد از انجام آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که دلیل معنی داری در هر دو مورد Viability و Mortality تفاوت معنی دار بین دوز ۱۲۵ ماکروفاژ با سایر دوزها و همچنین با گروه کنترل مثبت می‌باشد. همانطور که در تصویر ۴ و ۵ مشخص است میانگین زنده مانی در دوز ۱۲۵ بیشتر از سایر دوزها و گروه کنترل می‌باشد و همچنین میانگین Mortality در این دوز کمتر از سایر دوزها و گروه کنترل می‌باشد.



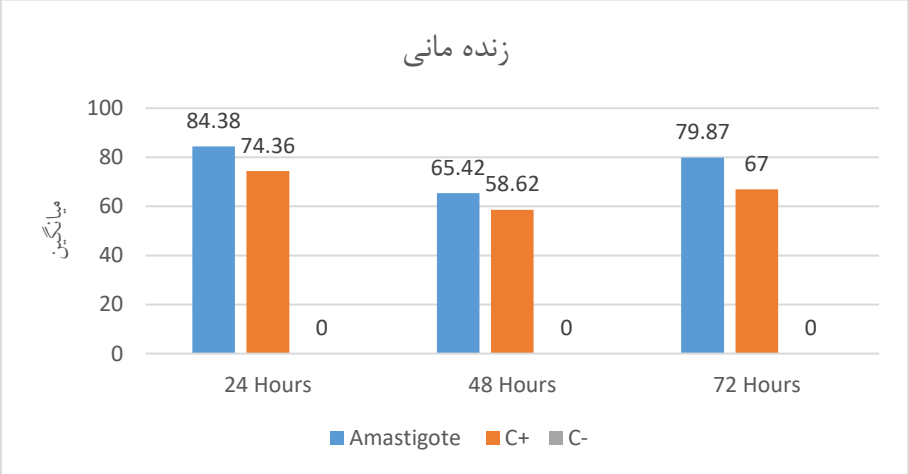
تصویر ۴: نتایج Viability و Mortality در گروه اماستیگوت + اسانس

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]



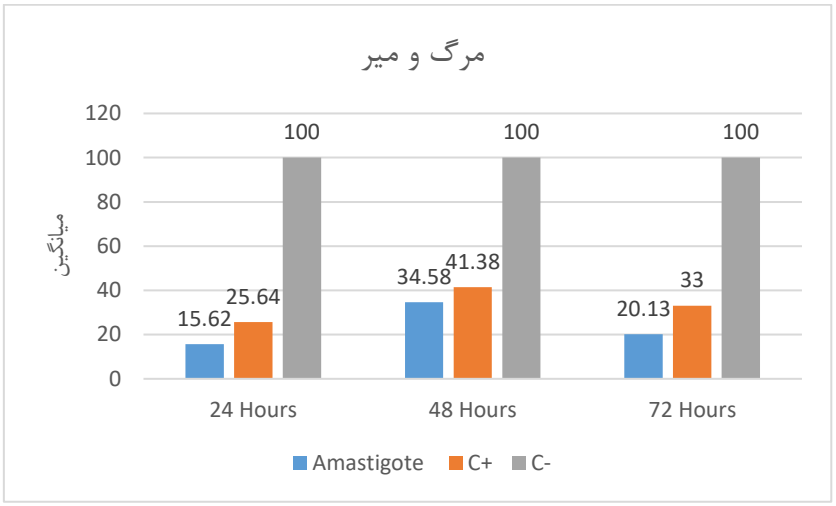
تصویر ۵: نتایج Viability و Mortality در گروه ماکروفاژ + اسانس

نتیجه بررسی Viabilityو Mortality در زمان‌های مختلف برای هر دو اسانس ماکروفاژ و اماستیگوت نسبت به گروه‌های کنترل معنی دار شد. همانطور که از تصاویر ۵ و۶ مشخص است در تمامی زمان‌ها میانگین Viability در گروه اماستیگوت + اسانس بیشتر از گروه‌های کنترل و میانگین Mortality در این گروه‌ها کمتر از دو گروه کنترل بوده است. درصد زنده‌مانی در گروه اماستیگوت در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۸۴/۳۸، ۶۵/۴۵ و ۷۹/۸۹ درصد می‌باشد (تصویر ۶). درصد مرگ و میر در این گروه مطابق با تصویر ۷ می‌باشد.



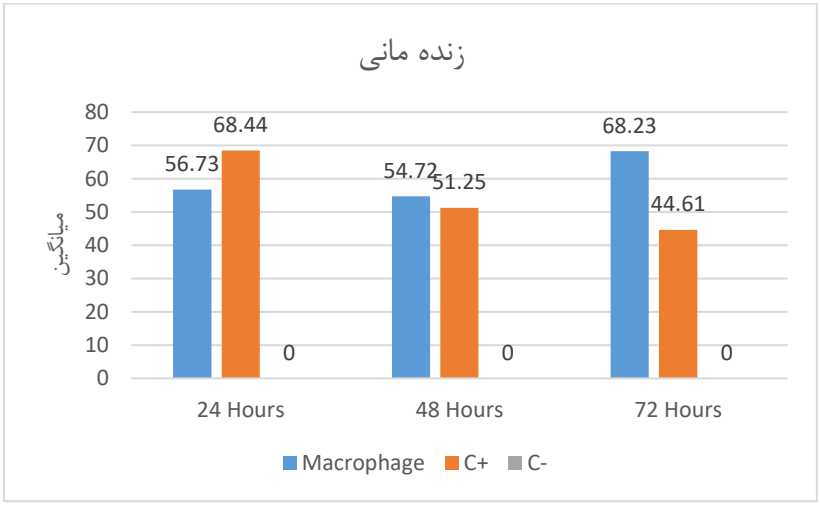
تصویر ۶: بررسی درصد زنده‌مانی در زمان‌های مختلف برای گروه اماستیگوت + اسانس

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]



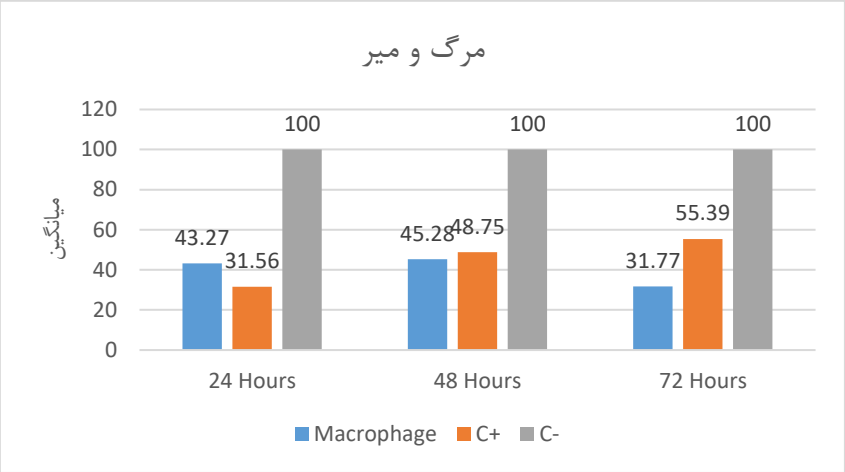
تصویر ۷: بررسی درصد مرگ و میر در زمان‌های مختلف برای گروه اماستیگوت + اسانس

درصد زنده‌مانی در گروه ماکروفاژ و اسانس در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۵۶/۷۳، ۵۴/۷ و ۶۸/۲۳ درصد می‌باشد (تصویر ۸). درصد مرگ و میر در این گروه مطابق با تصویر ۹ می‌باشد.



تصویر ۸: بررسی زنده مانی در زمان‌های مختلف برای گروه ماکروفاژ و اسانس

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]



تصویر ۹: بررسی مرگ و میر در زمان‌های مختلف برای گروه ماکروفاژ و اسانس

بحث

مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که اسانس گیاه بومی ایران، زرین‌گیاه (*D. kotschyi*)، دارای فعالیت بیولوژیکی علیه فرم آماستیگوت درون‌سلولی انگل *L. major* است. یافته کلیدی این پژوهش، تعیین مقادیر غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد (IC50) برابر با µg/mL ۱۱۳۶/۵۳ و غلظت سمیت سلولی ۵۰ درصد (CC50) برابر با µg/mL ۱۹۳/۶۰ بود. بر اساس مقادیر فوق، شاخص انتخاب‌پذیری (Selectivity Index = CC50 / IC50)برای اسانس زرین‌گیاه محاسبه شد که برابر با ۰/۱۷ بود. این مقدار نشان‌دهنده انتخاب‌پذیری پایین اسانس نسبت به سلول‌های میزبان است. مقایسه این دو مقدار نشان می‌دهد که اسانس زرین‌گیاه سمیت بیشتری برای سلول‌های میزبان (ماکروفاژ) نسبت به انگل دارد .(CC50 < IC50) این شاخص انتخاب‌پذیری پایین، که یک پارامتر حیاتی در ارزیابی داروهای ضد میکروبی است، پتانسیل درمانی اسانس خام را در فرم فعلی آن محدود می‌سازد. در این مطالعه، مقدار شاخص انتخاب‌پذیری (SI) اسانس زرین‌گیاه برابر با ۰/۱۷ به دست آمد که نشان‌دهنده آن است که سمیت اسانس بر سلول‌های میزبان بیش از اثر مهاری آن بر انگل است. معمولاً مقادیر SI بالاتر از ۱۰ به عنوان شاخصی از انتخاب‌پذیری مطلوب در نظر گرفته می‌شوند؛ بنابراین، اسانس خام در فرم فعلی خود فاقد پتانسیل درمانی ایمن است و نیاز به خالص‌سازی ترکیبات فعال یا اصلاح فرم دارویی دارد. با این وجود، فعالیت ضد لیشمانیایی مشاهده شده با نتایج مطالعات متعدد بر روی سایر گیاهان دارویی همخوانی دارد. به عنوان مثال، در مطالعات مشابه، مقادیر IC50 برای عصاره گیاهانی چون یونجه سیاه (۴۵ µg/mL) و برگ‌بو (۵۸۹.۵ µg/mL) گزارش شده است (۱۳). اگرچه مقایسه مستقیم دشوار است، اما این داده‌ها در مجموع تأیید می‌کنند که متابولیت‌های ثانویه گیاهی منبعی قدرتمند برای کشف ترکیبات ضد انگلی هستند. در مقایسه با کنترل مثبت، اسانس زرین‌گیاه در بالاترین غلظت (۲۰۰۰ µg/mL) بقای انگل را به ۶۷/۹۹ درصد رساند، در حالی که آمفوتریسین B در غلظت ۱۲۳.۵ میکرومولار، بقای انگل را به ۶۶/۶۶ درصد کاهش داد که نشان‌دهنده فعالیت ضعیف‌تر اسانس نسبت به داروی استاندارد است. مکانیسم احتمالی این فعالیت ضد انگلی را می‌توان به ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه نسبت داد. هرچند در این مطالعه آنالیز GC-MS انجام نشد، اما مطالعات پیشین نشان داده‌اند که زرین‌گیاه سرشار از ترکیباتی نظیر ژرانیول، لیمونن و فلاونوئیدها است. این ترکیبات دارای خواص ضدمیکروبی اثبات‌شده‌ای هستند و ممکن است از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو یا اختلال در غشای سلولی انگل، اثر مهاری خود را اعمال کنند (۱۴, ۱۵). با این حال، بدون آنالیز شیمیایی دقیق اسانس مورد استفاده، این بخش در حد فرضیه باقی می‌ماند. این مطالعه با محدودیت‌های مهمی نیز همراه بود که باید در نظر گرفته شوند. اولاً، آنالیز شیمیایی (GC-MS) برای شناسایی و تعیین درصد ترکیبات فعال اسانس انجام نشد. ثانیاً، اثر اسانس تنها بر روی فرم آماستیگوت بررسی شد و فعالیت آن علیه فرم پروماستیگوت ارزیابی نگردید. ثالثاً،

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]

آزمایش‌ها تنها بر روی رده سلولی ماکروفاژ موشی انجام شد و سمیت آن بر روی سلول‌های انسانی بررسی نشد. علاوه بر این، فعالیت اسانس علیه سویه‌های مقاوم به دارو و همچنین پایداری ترکیبات فعال آن در طول زمان، مورد مطالعه قرار نگرفت

نتیجه‌گیری کلـــی و پیشنهادها

در مجموع، این پژوهش نشان داد که اسانس خام زرین‌گیاه (*D. kotschyi*) دارای فعالیت ضد لیشمانیایی متوسط و سمیت سلولی قابل توجهی در شرایط *in vitro* است. با توجه به شاخص انتخاب‌پذیری پایین، استفاده مستقیم از اسانس خام به عنوان یک گزینه درمانی توصیه نمی‌شود. با این حال، این نتایج راه را برای تحقیقات آینده هموار می‌کند.

بر این اساس، پیشنهاد می‌شود در گام اول، آنالیز فیتوشیمیایی دقیق (GC-MS) بر روی اسانس انجام شود تا ترکیبات اصلی آن شناسایی گردند. سپس، با جداسازی این ترکیبات، می‌توان فعالیت ضد لیشمانیایی و سمیت سلولی هر یک را به صورت جداگانه ارزیابی کرد تا مولکول‌های کاندیدا با بیشترین اثربخشی و کمترین سمیت شناسایی شوند. پس از آن، مطالعات درون‌تنی (*In Vivo*) بر روی ترکیبات خالص‌شده می‌تواند اثربخشی واقعی آن‌ها را در یک مدل زنده مشخص نماید.

تقـــدیر و تشـــکر

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری و حمایت‌های بی‌دریغ تمام افرادی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یاری رساندند، صمیمانه قدردانی نمایند. بدین وسیله از گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌شود. از پرسنل محترم آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و همچنین مسئولین محترم انستیتو پاستور ایران که در تهیه سویه انگل و رده سلولی همکاری نمودند، سپاسگزاریم.

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری حرفه ای با عنوان «بررسی آزمایشگاهی تاثیر ضد لیشمانیایی اسانس زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) در مقایسه با داروهای رایج بر رشد آماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور*» است. پژوهش حاضر با تاییدیه کمیته اخلاق در پژوهش با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1400.034 انجام گرفته است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در انجام این پژوهش و نگارش مقاله حاصل از آن، هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

فهرست منابع

[1] Iranpour S, Hosseinzadeh A, Alipour A. Efficacy of miltefosine compared with glucantime for the treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. Epidemiol Health. 2019;41:e2019011.

[2] Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? Drug Design, Development and Therapy. 2018;12:25-40.

[3] Rasa SF. Investigating the therapeutic effect of medicinal plants on cutaneous leishmaniasis wounds: a systematic review. Avan's first annual student congress; Khozestan pro.2020.

[4] Ashrafi B, Ramak P, Ezatpour B, Talei GR. Investigation on Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Properties of Essential Oil from Dracocephalum kotschyi Boiss. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2017;14(3):209-17.

[5] Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. Curr Drug Metab. 2018;19(13):1100-10.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]

[6] Nasiri V. An overview of the recent findings in the cultivation of Leishmania. Reviews and Research in Medical Microbiology. 2017;28(1).
[7] Yin L, Bian H, Yan C, Liu S, Lu L, Zhou J. Prestressed compressive strength model of engineered cementitious composite subjected to freeze–thaw damage in cryogenic freezing state. Construction and Building Materials. 2023;393:132013.
[8] Arunachalam K, Sreeja PS. MTT Assay Protocol. Advanced Cell and Molecular Techniques: Protocols for In Vitro and In Vivo Studies: Springer; 2025. p. 271-6.
[9] van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods in Molecular Biology. 2011;731:237-45.
[10] Mohtasebi S, Mohebali M, Elikaee S, Akhoundi B, Foroushani AR, Teimouri A, et al. In vitro and in vivo anti-parasitic activity of biogenic antimony sulfide nanoparticles on Leishmania major (MRHO/IR/75/ER). Parasitology Research. 2019;118(9):2669-78.
[11] Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. Int J Endocrinol Metab. 2012;10(2):486-9.
[12] McDonald JH. Handbook of Biological Statistics. 3rd ed. Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing; 2014. 296 p.
[13] Nikmehr B, Ghaznavi H, Rahbar A, Sadr S, Mehrzadi S. In vitro anti-leishmanial activity of methanolic extracts of Calendula officinalis flowers, Datura stramonium seeds, and Salvia officinalis leaves. Chin J Nat Med. 2014;12(6):423-7.
[14] Nik aeein I, Sharifi sirchi G, Sharifi I. The in vitro effect of alcohlic extract of Laurus nobilis leaves on Leishmania major promastigote stage by colorimetric assay. Agricultural Biotechnology Journal. 2021;13(1):75-92.
[15] Gharirvand Eskandari E, Setorki M, Doudi M. Medicinal Plants With Antileishmanial Properties: A Review Study. Pharmaceutical and Biomedical Research. 2020;6(1):1-16.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]

"This journal is following of Committee on Publication Ethics (COPE) and complies with the highest ethical standards in accordance with ethical laws". This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2023 Zoonosis.

Research Article

In vitro Evaluation of the Antileishmanial Activity of *Dracocephalum kotschyi* Essential Oil Against *Leishmania major* Amastigotes Compared with Standard Drugs

Saeed Nezaratizadeh[1], Faham Khamsipour[2]*, Seyed Hossein Hejazi[3]

1. Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Food and Drug Research Center, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.
3. Department of Parasitology and Mycology, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

***Corresponding author:** faham.khamesipour@yahoo.com

Received: 2025/9/29 Accepted: 2025/12/4

Abstract

Leishmaniasis, a zoonotic parasitic disease, is a significant public health concern. Current therapeutic approaches, primarily based on pentavalent antimonial compounds, are associated with notable limitations and adverse effects, underscoring the urgent need for alternative, effective treatments. Medicinal plants offer promising avenues for the development of novel therapeutic agents. This study aimed to evaluate the antileishmanial activity of the essential oil of *Dracocephalum kotschyi* against the amastigote form of *Leishmania major* and compare its efficacy to standard drugs. In this experimental in vitro study, promastigotes of the standard *L. major* strain were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Infected macrophages containing parasite amastigotes were exposed to varying concentrations of *D. kotschyi* essential oil, with Amphotericin B used as the positive control. After incubation, cytotoxicity and amastigote survival rates were assessed using the MTT colorimetric assay, and optical density (OD) values were measured with an ELISA reader. The 50% inhibitory concentration (IC50) was calculated for both the essential oil and the control drug. Results revealed that *D. kotschyi* essential oil exhibited a dose-dependent inhibitory effect on the growth of intracellular amastigotes ($p < 0.05$). The IC50 of the essential oil against amastigotes was 1136.53 µg/mL, while the 50% cytotoxic concentration (CC50) on macrophage cells was 193.60 µg/mL. These findings highlight the potential of *D. kotschyi* essential oil as an effective antileishmanial agent, capable of eliminating infected macrophages. Consequently, this plant-derived compound represents a promising candidate for further in vivo studies aimed at developing topical formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania major*, *Dracocephalum kotschyi*, cytotoxicity, MTT, IC50.

How to cite this article: Nezaratizadeh S, Khamsipour F, Hejazi SH. *In vitro* Evaluation of the Antileishmanial Activity of *Dracocephalum kotschyi* Essential Oil Against *Leishmania major* Amastigotes Compared with Standard Drugs. Journal of Zoonosis. 2023; 3 (4):26-36.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-05-20]