Research in Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.38, No.4, winter 2014

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 0:47 +0330 on Monday November 19th 2018

The effect of garlic extract on *Leishmania major* Amastigotes: *in vitro* and *in vivo* studies

Ali Bagherin[1], Hossein Abbaspour[2], Sakineh Saeidisar[3], Motahareh Mirzaei[4], Hamid Reza Mirzaei[5], Hamed Mirzaei[6]

[1] *Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran*
[2] *Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran*
[3] *Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran*
[4] *Departemnt of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Gorgan, Gorgan, Iran*
[5] *Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[6] *Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

(Received 21 May, 2014 Accepted 1 Mar, 2015)

Abstract

Background: In respect to leishmaniasis prevalence in different regions of Iran and world and also several side effects of *pentavalent antimony* for treatment of the disease, using of medicinal plants have been recently taken into attention. The aim of this study was to evaluate the effect of garlic plant extract on *L. major amastigotes* in vivo and in vitro by means of colorimetric assay.
Materials and methods: *L.major* (MRHO/IR/75/ER) were transferred to RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics then grown at 25±2°C. In p*lateau* phase of parasite growth, effect of different concentrations of garlic plant extract in comparison to control drug, tartar emetic, on *L.major amastigotes* were assessed by means of MTT assay in vivo and in vitro. The optical density (OD) due to reduction of the tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to a colored product formazan by the parasite was measured by ELISA reader and the IC50 values (50% inhibitory concentrations) were further measured. All experiments were repeated in triplicate.
Results: Gained data from OD and IC50 showed that concentrations of 4.6 µg/ml and 11.4 µg/ml of garlic extract in comparison to control drug after incubation of 48 hours in vivo and in vitro respectively have inhibitory effect on *amastigotes* of *L.major*.
Conclusion: In respect to profound anti-leishmania effect of garlic medicinal plant on *L.major* , further experiments are required to evaluate the effect of this extract on Leishmania parasite in animal models and voluntary individuals.

Keywords: *Amastigote*, *L.Major*, Garlic, MTT assay.

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات ۱۸۱ تا ۱۸۶

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 0:47 +0330 on Monday November 19th 2018

تاثیر عصاره سیر بر روی آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور: "مطالعه درون تنی و برون تنی"

علی باقریان[۱]، حسین عباسپور[۲]، سکینه سعیدی سار[۳]، مطهره میرزایی[۴]، حمید رضا میرزایی[۵]، حامد میرزایی[۶]

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
[۲] دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
[۳] دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
[۴] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گرگان
[۵] گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۶] گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به شیوع لیشمانیوز در مناطق مختلف جهان و ایران و نظر به اینکه ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان برای درمان بیماری دارای عوارض جانبی متعددی می باشد، استفاده از گیاهان دارویی مورد تاکید قرار گرفته است. این تحقیق به منظور تعیین تاثیر عصاره گیاه دارویی سیر بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی (In vitro) ودرون تنی (In vivo) به روش رنگ سنجی انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، لیشمانیا ماژور(Leishmania major) سویه استاندارد به محیط کشت RPMI- 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی(FCS) و آنتی بیوتیک منتقل و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس در مرحله ثابت رشد تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی سیر در مقایسه با داروی کنترل تارتارامتیک بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور در دو شرایط درون تنی و برون تنی با استفاده از روش رنگ سنجی MTT، مورد بررسی قرار گرفت که شرایط درون تنی با استفاده از کشت ماکروفاژی ایجاد شد. سپس میزان جذب نوری (Optical Density) رنگ حاصله از احیا نمک تترازولیوم (MTT) به محصول رنگی فورمازان توسط انگل، بوسیله دستگاه الیزا ریدر (ELISA reader) سنجیده شد و مقدار IC 50 محاسبه گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از جذب نوری و IC_{50} نشان داد که غلظت ۴/۶ µg/ml عصاره سیر در مقایسه با داروی کنترل در شرایط درون تنی نسبت به غلظت ۱۱/۴ µg/ml در زمان ۴۸ ساعت در شرایط برون تنی باعث مهار رشد آماستیگوت های لیشمانیا ماژور گردید.

نتیجه‌گیری: عصاره سیر بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد، آزمایشات بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا در مدل حیوانی و انسان های داوطلب را توصیه می نماید.

واژگان کلیدی: آماستیگوت، لیشمانیا ماژور، ماکروفاژ، روش MTT.

مقدمه

لیشمانیوز جلدی (سالک) یکی از بیماری‌های انگلی شایع انتقالی توسط پشه خاکی است که در بسیاری از کشورهای حاره و نیمه حاره جهان شیوع دارد. تخمین زده می‌شود که حدود ۱۲ میلیون مورد لیشمانیوز جلدی در نقاط مختلف جهان وجود داشته باشد و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به این بیماری قرار دارند. در حال حاضر ۸۸ کشور جهان به لیشمانیوز جلدی آلوده هستند. میزان بروز لیشمانیوز جلدی در ایران به طور متوسط ۰/۲۸ در هر هزار نفر جمعیت است . سالیانه حدود ۲۰۰۰۰ مورد لیشمانیوز جلدی از نقاط مختلف ایران گزارش می شود که میزان واقعی آن را چندین برابر میزان گزارش شده تخمین می‌زنند (۳). متاسفانه علی رغم شیوع قابل توجه لیشمانیوز جلدی در ایران، هنوز روش پیشگیری، کنترل و درمان مناسبی وجود ندارد (۴). ایجاد زخم‌های بدشکل و طولانی مدت در مناطقی از بدن نظیر صورت و ایجاد آلودگی‌های ثانویه در این بیماری ، درمان بیماری را ضروری می سازد. این داروها به علت تکرار عمل تزریق و دوز بالا

آدرس نویسنده مسئول: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دکتر علی باقریان (**e-mail:** a.bagherian63@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۲/۳۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 0:47 +0330 on Monday November 19th 2018

علاوه بر تحمیل خسارات اقتصادی بر خانواده‌ها منجر به بروز عوارض جانبی همچون اختلالات کبدی، قلبی و بیوشیمیایی می‌شوند. به علاوه، این ترکیبات دارای محدودیت‌هایی از قبیل عدم تاثیر به روش خوراکی، طولانی بودن دوره درمان و عدم پاسخ درمانی در حدود ۱۵-۱۰ درصد موارد می‌باشند (۵، ۶).در حال حاضر تحقیقات وسیعی بر روی روش های درمانی لیشمانیوز در حال انجام است. در طب سنتی ایران از گیاهان دارویی برای درمان یا کاهش سطح ضایعه لیشمانیوز جلدی استفاده شده است (۷).

لذا محققین را بر آن داشته که داروهای گیاهی جدید را با مشکلات و عوارض کمتری بررسی کنند. مکانیسم دفاعی بدن برای کنترل انگل داخل سلولی لیشمانیا وابسته به عملکرد سلول Th1 است. این سلول‌ها با فعال کردن ماکروفاژها، موجب ترشح مقدار زیادی از سایتوکاین‌هایی می‌شوند که در افزایش فعالیت ایمنی سلول نقش اساسی دارند. ماکروفاژها نقش مهمی را در آغاز و تنظیم پاسخ های ایمنی بدن و نیز در محیط کشت ایفا می‌کنند. از طرفی، عوامل انگل و مکانیسم میزبان نیز ارتباط نزدیکی با بیماری‌زایی دارند. لذا در ابتدا برای ایجاد یک عفونت اولیه، پروماستیگوت‌ها به آرامی وارد ماکروفاژها می‌شوند تا با فرار از پاسخ ایمنی میزبان، بسته به وجود ماکروفاژهای ساکن، عفونت داخل سلولی (آماستیگوت) را دوباره فعال کنند (۸). در همان زمان، پاسخ‌های ایمنی میزبان با مکانیسم‌های ایمنی غیراختصاصی (ذاتی) و ایمنی اکتسابی (ایمنی سلولی و حساسیت تاخیری) به این واکنش پاسخ می‌دهد و تحت شرایط مطلوب ماکروفاژها به طور گسترده فعالیت نابود سازی لیشمانیا را تحت هدایت پاسخ سلول های T-Helper به انجام می‌رسانند (۶، ۹). در بین ترکیبات سیر، اثر ضد انگلی آلیسین قابل توجه است (۱۰). در گزارشاتی نیز تاثیر درمانی عصاره آبی سیر بر هیمنولیپس نانا و ژیاردیا نشان داده شده است. از دیگر اثرات سیر مهار رشد لیشمانیای ماژور است (۹). در یک مطالعه، اثر غلظت‌های µl/ml ۲۵۰، ۲۰۰ ، ۱۰۰ ، ۵۰ ، ۲۰ عصاره سیر در محیط کشت لیشمانیای ماژور بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد کمترین غلظت مورد استفاده در این مطالعه توانسته رشد انگل را در محیط مهار نماید و منحنی رشد انگل را به صفر برساند (۲).

تحقیقات نشان داده‌اند اثرات ایمنومدولاتوری سیر شامل تقویت پاسخ‌های سلولی و افزایش ازدیاد حساسیت تاخیری، تمایل پاسخ‌های سایتوکاینی به سمت Th1 در مدل لیشمانیوز، افزایش فعالیت سلول کشنده طبیعی در مقابل تومور، افزایش ماکروفاژها و تقویت بلع و هضم انگل لیشمانیا ماژور می‌باشد (۶).

مواد و روشها

تهیه عصاره سیر

برای تهیه عصاره سیر مقدار ۵۰۰ گرم از حبه های پوست کنده سیر که یک شب در فریزر نگهداری شده بود به همراه آب مقطر استریل در مخلو ط کن خرد، سپس چند بار از میان پارچه استریل و فیلتر واتمن(Whatman Filter) عبور داده وصاف شد .محلول به دست آمده با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار، سانتریفوژ شده و مایع رویی به عنوان عصاره آبی سیر جدا شد. به منظور مشخص بودن رقت تام، هنگام مخلو ط کردن از رقت یک به یک سیر وآب مقطر استفاده شد.

تهیه کنترل

از داروی تارتارامتیک (Potassium antimony 3- oxide tartrate hemihydrate) به عنوان کنترل استفاده گردید. این دارو یک آنتی موان سه ظرفیتی است که به صورت پودر از شرکتMerck آلمان تهیه گردید.

تهیه وکشت سلولی ماکروفاژها

سلول‌های ماکروفاژ استفاده شده در این مطالعه از نوع ماکروفاژهای انسانی THP-1بودند که از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شده بودند. این سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلولی T-75 نگهداری و تکثیر داده می‌شدند. محیط مورد استفاده برای نگهداری و تکثیر این سلول‌ها RPMI1640 بود که با سرم جنینی گاوی (FBS) ده درصد غنی شده بود. کشت‌های سلولی بعد از رسیدن به تلاقی هفتاد درصد پاساژ داده می‌شدند. سلول‌های رده THP-1 تقریبا کند رشد بودند و بعد از سه روز از پاساژ قابل برداشت و آماده آلوده شدن با لیشمانیا بودند. در ضمن فلاسک‌های کشت سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد Co_2 نگهداری می‌شدند (۱۱).

تهیه و کشت انگل

انگل‌های استفاده شده در این مطالعه از نوع لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) بودند که از بانک سلولی گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شدند. این انگل‌ها درفالکون‌های استریل حاوی محیط کشت NNN و RPMI1640 غنی شده با سرم جنینی گاوی (FBS) ده درصد در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و تکثیر داده شدند. انگل‌ها به طور روزانه از لحاظ نیاز به محیط کشت تازه و Viability بررسی می‌شدند، به طوری که این

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 0:47 +0330 on Monday November 19th 2018

سلول‌ها هر دو روز نیاز به نیم سی سی محیط کشت RPMI1640 غنی شده با FBS داشتند (۵).

نحوه ایجاد آماستیگوت در محیط برون تنی (شرایط اپتیمم)

برای ایجاد فرم آماستیگوت لیشمانیا ماژور بدون حضور ماکروفاژ، ابتدا محیط کشت RPMI1640 غنی شده با سرم جنینی گاوی (FBS) ده درصد pH آن از ۷ به ۵/۲ کاهش یافت. سپس تعداد $۱۰^۶$ انگل لیشمانیا ماژور به آن اضافه شده و در فلاسک‌های استریل ریخته شدند. این فلاسک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO2 نگهداری شده و دمای آن به طور روزانه به اندازه ۲ تا ۳ درجه تا دمای ۳۲ درجه سانتی گراد افزایش یافت. انگل‌ها در طی این مدت ۴ روز از فرم پروماستیگوت به فرم آماستیگوت تبدیل شدند (۱۲).

آلوده کردن ماکروفاژها به انگل (شرایط درون تنی)

در ابتدا $۱۰^۶ \times ۳$در میلی لیتر سلول ماکروفاژی را به فلاسک کشت سلولی انتقال داده و تعداد $۱۰^۶ \times ۱۵$در میلی لیتر انگل لیشمانیا ماژور را به فلاسک سلولی حاوی ماکروفاژها انتقال داده شد (نسبت تعداد ماکروفاژها به لیشمانیا ۱ به ۵ بود). فلاسک حاوی ماکروفاژهای آلوده به مدت ۲۴ ساعت در انکوبه شد تا انگل‌ها وارد ماکروفاژها شوند. سپس به وسیله cell scraper ماکروفاژها از سطح فلاسک جدا شدند (۱).

تست رنگ سنجی با روشMTT

آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فورمول شیمیائی۳-(۴،۵)-2,5--dimethylthiazol-2-yl) (diphenyl-tetrazolium bromide (MTT به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. در این روش برخلاف سایر روش‌ها مراحل شستشو و هاروست کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها می‌شوند حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فتومتر، در یک میکروپلیت انجام می‌شوند. لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است. برای تهیه محلول MTT، ۵ میلی گرم از پودرMTT را در ۱ میلی لیتر محلولPBS استریل (5 mg/ml) حل کردیم (۱۵-۱۳).

اضافه کردن ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا ماژور، عصاره و داروی کنترل به پلیت

از آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور موجود در محیط کشت که در فاز ثابت رشد (Stationary phase) بودند، به میزان ۱۰۰µl برداشته و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت تریپلیکیت اضافه کردیم، یعنی در هر چاهک $۱۰^۵ \times ۱$ آماستیگوت قرار گرفت. در ادامه، از عصاره‌های مختلف و داروی کنترل که به ترتیب درغلظت‌های ۱۵/۵، ۲۵/۵، ۴۰، ۷۵ و ۱۵۰میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد و به میزان ۱۰ µl به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت تریپلیکیت اضافه گردید.

آماستیگوت‌های ایجاد شده در شرایط اپتیمم (بدون حضور ماکروفاژ) به میزان ۵۰µl برداشته و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت تریپلیکیت اضافه کردیم، یعنی در هر چاهک $۱۰^۵ \times ۱$ آماستیگوت قرار گرفت.

علاوه بر این از شاهد (بلانک) نیز استفاده شد، بدین صورت که در یک چاهک پلیت فقط سلول و محیط کشت و در یک چاهک سلول و DMSO ۵٪ و در چاهک دیگر محیط کشت بدون سلول یا دارو به میزان ۱۰۰ µl اضافه گردید (به صورت تریپلیکیت). بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، پلیت‌ها را خارج کرده و به میزان ۱۰٪ حجم هر چاهک از محلول ذخیره MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) که قبلا تهیه شده بود به داخل هر چاهک ریخته شد. چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰ µl محیط کشت و فقط حاوی ۱۰ µl از محلول MTT بود.

تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون آماری ANOVA برای مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه‌ها و در صورت معنی دار بودن از آزمون Post Hoc-Dunnett برای تعین اثر بخشی داروی کنترل و عصاره‌ها استفاده شد. سطح معنی داری $P<۰/۰۵$ و فاصله اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد.از نرم افزار SPSS version ۱۶ برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. همچنین با استفاده از دستگاه الایزا ریدر(ELISA reader) و جذب نوری (OD) به دست آمده براساس فرمول زیر میزان IC_{50} با نرم افزارExcel محاسبه گردید:

$$Log(IC50) = log(x1) + ((y1-y0/2)(y1-y2))(log(x2) - log(x1))$$

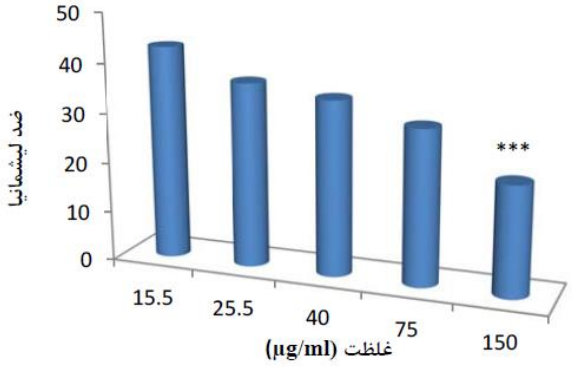
در فرمول فوقy1 مقدار انگل درغلظتx1 و همه غلظت‌های کمتر و y2 مقدار انگل در غلظت x2 و همه غلظت‌های بیشتر می‌باشد. همچنین y0 مربوط به جذب نوری گروه کنترل است که نشان دهنده مقدارانگل مربوط به کنترل می‌باشد (۲).

یافته‌ها

این بررسی در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. اثر ضدلیشمانیایی غلظت‌های مختلف داروی کنترل (تارتارامتیک) اختلاف معنی داری با هم داشت ($p<۰/۰۰۰۱$) و این اختلاف

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 0:47 +0330 on Monday November 19th 2018

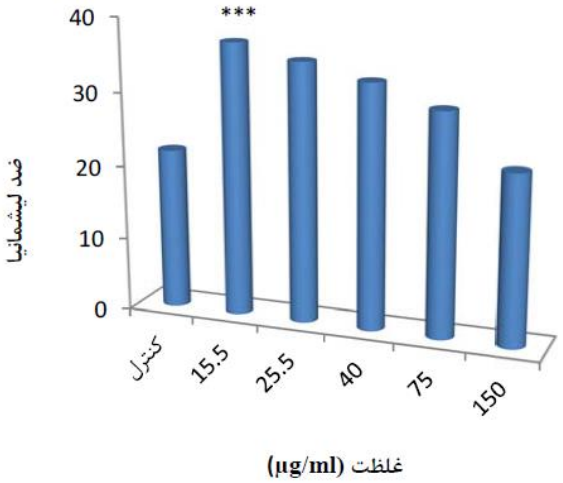
در آزمونPost Hoc مربوط به اختلاف در غلظت ۱۵۰ µg/ml با سایر غلظت‌ها بود که نشان دهنده آن است که این دارو رشد پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور را مهار می‌کند (نمودار ۱). ا ثر غلظت ۱۵۰ µg/ml داروی کنترل بر روی آماستیگوت‌ها نسبت به غلظت‌های دیگر عصاره سیر، مقایسه گردید. سپس غلظتهای مختلف عصاره به صورت جداگانه با غلظت µg/ml ۱۵۰ داروی کنترل، مورد ارزیابی قرار گرفت.



نمودار ۱- میزان ضد لیشمانیایی بر حسب غلظت های مختلف دارو. *** تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۱۵۰ µg/ml با سایر غلظت‌ها مشاهده شد (P<۰/۰۰۰۱).

تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیر در شرایط درون تنی

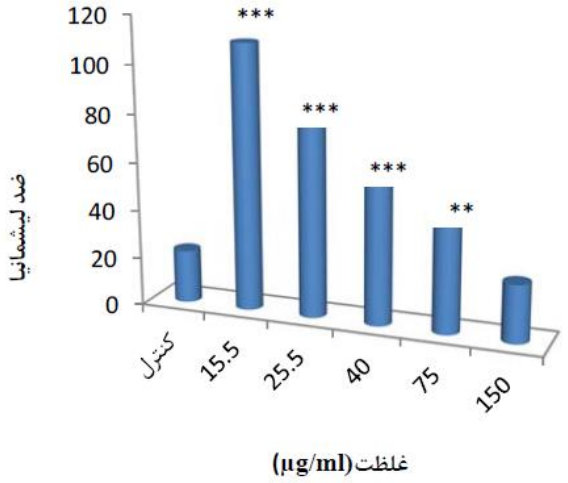
مقایسه میانگین جذب نوری عصاره سیر و داروی کنترل نشان داد که بین این گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۱).



نمودار۲- میزان جذب نوری بر حسب غلظت‌های مختلف عصاره سیر در شرایط درون تنی. ***P<۰/۰۰۱، گروه کنترل: داروی تارتارامتیک

تاثیر غلظت‌های مختلف سیر در شرایط برون تنی

به طور کلی میانگین جذب نوری در گروه های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) که در غلظت‌های ۱۵/۵ و ۲۵/۵ µg/ml به طور معنی داری (P<۰/۰۰۱) میانگین جذب نوری بالاتر بود و در آزمونPost Hoc اختلاف معنی داری بین غلظت های فوق و گروه کنترل دیده شد.



نمودار ۳- میزان جذب نوری بر حسب غلظت‌های مختلف عصاره سیر در شرایط برون تنی. *** P<۰/۰۰۱ و ** P<۰/۰۱، کنترل: داروی تارتارامتیک.

بحث

در سال‌های اخیر وجود مواد ایمنومدولاتور درگیاه سیر توسط محققین متعددی گزارش شده است. تحقیق نشان داد که در عصاره سیر در شرایط برون تنی دارای کمترین تاثیر است و در غلظت‌های µg/ml ۱۵/۵، ۲۵/۵، ۴۰ و ۷۵ بی‌تاثیر می‌باشد و تنها در غلظت µg/ml ۱۵۰ با داروی کنترل همخوانی دارد و از طرفی این عصاره در شرایط درون تنی بهترین تاثیر را از خود نشان داد و فقط در غلظت µg/ml ۱۵/۵ بی تاثیر بود و در غلظت‌های دیگر با داروی کنترل همخوانی داشت. نتایج نشان داد از بین غلظت‌های µg/ml ۱۵/۵، ۲۵/۵، ۴۰، ۷۵ و ۱۵۰، بهترین غلظت از عصاره سیر که در آن نیمی از آماستیگوت‌ها تخریب می‌شوند، در شرایط درون تنی غلظتµg/ml ۴/۶ و در شرایط برون تنی غلظتµg/ml ۱۱/۴ پس از گذشت ۴۸ ساعت می‌باشد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها و داروی تارتارامتیک، اثر مهاری بر روی آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط درون تنی نسبت به شرایط برون تنی افزایش می‌یابد و کاهش جذب نوری (OD) نشان دهنده این اثر مهاری می‌باشد. دلیل افزایش جذب نوری نیز مربوط به رنگ

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 0:47 +0330 on Monday November 19th 2018

فورمازانی است که به وسیله فعالیت متابولیکی آنزیم میتوکندریایی دهیدروژناز در سلول های فعال و زنده تولید می‌شود که با تعداد سلول‌های زنده در ارتباط است. در مطالعه حاضر مقایسه میانگین جذب نوری اسانس‌های مورد بررسی و داروی کنترل، دارای اختلاف معنی‌داری بود که این نشان می‌دهد همه غلظت‌های عصاره به نسبت‌های مختلفی باعث کاهش رشد انگل لیشمانیا ماژور شدند. مطالعات فراوانی نیز در سال‌های اخیر بر روی اثرات عصاره سیر بر لیشمانیا انجام شده است،که محققین معتقدند تاثیر آن بر انگل لیشمانیا از طریق سیستم ایمنی صورت می‌گیرد. در مطالعه‌ای که احمدی و همکارانش در دانشگاه علوم پزشکی بقیه االه ایران انجام دادند، اثر عصاره سیر در بهبود زخم‌های ناشی از لیشمانیا ماژور از موش‌های آلوده از طریق افزایش نیتریک اکساید تایید گردید که پس از آلوده کردن موش‌ها با 3×10^7 عدد پروماستیگوت، زخم ایجاد شده را با عصاره سیر تیمار نمودند و قطر زخم‌ها را در روزهای اول، دهم، سی ام و چهل و پنجم اندازه گیری کردند. نتایج نشان داد درمان ۳۰ روزه عصاره سیر باعث کاهش قطر زخم می‌شود. این محققین درمان موثر سیر را از طریق اثر بر افزایش نیتریک اکساید بیان کردند (۱۶، ۱۷). Unlum و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در یک تحقیق نشان دادند سیر در درمان زخم‌های ناشی از لیشمانیای ماژور در انسان اثر مثبت واضحی دارد، به طوری که بیماران شرکت کننده در مطالعه که تحت تاثیر عصاره سیر قرار گرفته بودند،۹۰٪ موارد به درمان با عصاره سیر پاسخ دادند که از این تعداد ۳۶٪ بهبودی کامل حاصل کردند و ۵۴٪ هم به بهبودی نسبی دست یافتند (۱۸). همچنین Rodriguez-Villamizar و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با مطالعه اثر سیر بر رشد انگل لیشمانیا و بهبود زخم گزارش نمودند که این مکانیسم از طریق افزایش سایتوکاین‌های مترشحه توسط سلول‌های Th1 صورت می‌گیرد (۱۹). در مطالعه دیگر در سال ۲۰۰۰ غضنفری گزارش نمود، اثر عصاره سیر با افزایش INFγ از Th1 و سوییچ سیستم ایمنی به سمت ایمنی سلولی صورت می‌پذیرد (۲۰). در بررسی که توسط Ohkusuk و همکارانش در سال ۲۰۰۰ انجام گردید، نشان داده شد بهبود ناشی از لیشمانیا در مدل حیوانی، ناشی از افزایش فعالیت ماکروفاژها و تولید نیتریک اکساید می‌باشد (۲۱). لذا شناسایی داروی موثر در درمان لیشمانیوز در تایید روش درمان نقش به سزایی دارد. داروهای رایج نظیر گلوکانتیم، اثرات جانبی فراوان به همراه آسیب مستقیم سلولی به همراه دارند. بنابراین، استفاده از داروهای گیاهی مانند سیر که قادر به از بین بردن انگل لیشمانیا از طریق تقویت و فعال کردن سیستم ایمنی است، از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

بر اساس یافته‌های این مطالعه، عصاره آبی سیر با غلظت ۴/۶ µg/ml در شرایط درون تنی و با غلظت ۱۱/۴ µg/ml در شرایط برون تنی به مدت ۴۸ ساعت، باعث مهار رشد آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود. لذا محققین را بر آن داشته که داروهای گیاهی جدید را با مشکلات و عوارض کمتری بررسی کنند. مکانیسم دفاعی بدن برای کنترل انگل داخل سلولی لیشمانیا وابسته به عملکرد سلول Th1 است. این سلول‌ها با فعال کردن ماکروفاژها، موجب ترشح مقدار زیادی از سایتوکاین‌هایی می‌شوند که در افزایش فعالیت ایمنی سلول نقش اساسی دارند. ماکروفاژها نقش مهمی را در آغاز و تنظیم پاسخ‌های ایمنی بدن و نیز در محیط کشت ایفا می‌کنند. از طرفی، عوامل انگل و مکانیسم میزبان نیز ارتباط نزدیکی با بیماری‌زایی دارند. لذا در ابتدا برای ایجاد یک عفونت اولیه، پروماستیگوت‌ها به آرامی وارد ماکروفاژها می‌شوند، تا با فرار از پاسخ ایمنی میزبان، بسته به وجود ماکروفاژهای ساکن، عفونت داخل سلولی (آماستیگوت) را دوباره فعال کنند (۸).

عصاره سیر قادر است پاسخ ایمنی سلول را تحریک نموده و باعث فعال شدن ماکروفاژها و سلول NK شود (۲۰، ۲۲). با توجه به اهمیت سایتوکاین‌های حاصل از سلول در توسعه و ایجاد پاسخ ایمنی سلولی و با توجه به یافته‌های فوق، مطالعه حاضر نشان داد عصاره سیر در شرایط درون تنی باعث افزایش تولید سایتوکاین‌ها می‌شود. با توجه به اینکه ماکروفاژها با ترشح سایتوکاین‌ها قادر به کنترل عفونت داخل سلولی و پیشرفت بیماری می‌باشند، طبیعی است که این سلول‌ها با دریافت سیگنال مناسب می‌توانند انگل را تخریب و یا حذف نمایند (۲۳).

REFERENCES

1. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with Leishmania amazonensis. J Leukoc Biol 2008;84:389-96.

2. Barati M, Sharifi I, Sharififar F. 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 2010;17:32-41.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 0:47 +0330 on Monday November 19th 2018

3. World Health Organization. WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. Geneva, Switzerland: WHO; 2000.
4. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95:239-43.
5. Duncan R, Alvarez R, Jaffe CL, Wiese M, Klutch M, Shakarian A, et al. Early response gene expression during differentiation of cultured *Leishmania donovani*. Parasitol Res 2001;87:897-906.
6. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004;27:305-18.
7. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS One 2012;7:e35671.
8. John DT, Petri WA, Markell EK, Voge M, eds. Markell and Voge's medical parasitology. New York: Elsevier Health Sciences; 2006.
9. Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, Ponte-Sucre A. Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites. Int J Antimicrob Agent 2007;29:637-42.
10. Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. New Engl J Med 2010;362:504-12.
11. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang K-O, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. PLoS Biol 2004;2:e432.
12. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharmaceut Design 2002;8:319-42.
13. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res 2006;123:399.
14. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. Phytochemistry 2005;66:2056-71.
15. Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia 2009;80:81-90.
16. Lamidi M, DiGiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C, Rondi M, et al. In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. J Ethnopharmacol 2005;102:185-90.
17. Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen T. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of Leishmania major promastigotes. Parasitol Res 1994;80:235-39.
18. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 1986;89:271-77.
19. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. Parasitol Int 2005;54:119-22.
20. Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue. Parasitol Int 2000;48:265-69.
21. Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. Res Microbiol 2004;155:224-30.
22. Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barria E, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. J Microbiol Methods 2003;55:813-16.
23. Estevez Y, Castillo D, Pisango MT, Arevalo J, Rojas R, Alban J, et al. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. J Ethnopharmacol 2007;114:254-59.