View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره چهارم، شماره ۲/ ۷-۱/ تابستان ۱۳۸۱

اثر عصاره سیر بر لیشمانیوز جلدی از طریق افزایش نیتریک اکساید

دکتر کاظم احمدی*، دکتر عباس محمودزاده✧✧، دکتر عبدالمجید چراغعلی**، علی‌اکبر اصفهانی✧✧

چکیده:

تولید نیتریک اکساید در بهبود زخم لیشمانیایی در حیوان و انسان مهم است. در این تحقیق اثر درمانی عصاره سیر به تنهایی یا همراه با ویتامین A با اثر داروی استاندارد گلوکانتیم در بهبود زخم لیشمانیایی و تولید نیتریک اکساید در مدل حیوانی مقایسه گردید. تعداد 1×10^5 عدد فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور به قاعده دم موش تزریق گردید. پس از به وجود آمدن زخم قطر آن اندازه گیری شد. موشها روزی دو بار با داروهای فوق و حداکثر به مدت ۴۵ روز به صورت موضعی تحت درمان قرار گرفتند. قطر زخم در طی روزهای ۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ روز اندازه گیری شد. در تجربه جداگانه‌ای ماکروفاژهای صفاقی همین موشها در محیط کشت از لحاظ میزان تولید نیتریک اکساید در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید مورد آزمایش قرار گرفته و مقدار ترشح نیتریک اکساید به روش گریس اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که درمان ۳۰ روزه با عصاره آبی سیر باعث کاهش قطر زخم می‌گردد. با این وجود حداکثر کاهش زخم در پاسخ به ۴۵ روز درمان و استفاده موضعی ۱۰ روز پماد ویتامین A قبل از استعمال عصاره آبی سیر به دست آمد. در موشهایی که سطح بهبودی زخم در آنها بیشتر بود مقدار نیتریک اکساید تولیدی نیز زیادتر بود.

واژه های کلیدی: لیشمانیازیس، سیر، نیتریک اکساید.

مقدمه:

سیر از خانواده زنبق با نام علمی *Allium Sativum* و دارای ترکیبات گوناگون است. هر چند بوی سیر ناشی از ماده آلیسین است ولی قبل از بریده شدن و یا خرد شدن بویی نداشته و یا بسیار ضعیف می‌باشد. به نظر می‌رسد که در نتیجه بریده شدن یا خرد شدن سیر این امکان به وجود می‌آید که آنزیمی بنام آلیناز با ماده آلئین تماس حاصل و آلیسین را به وجود می‌آورد (۶).

سیر از زمانهای قدیم در درمان بعضی از بیماریهای عفونی استفاده می‌شده است. قبل از این که آنتی‌بیوتیک جدید در دسترس افراد قرار گیرد در اپیدمیهای تیفوس، وبا، اسهال خونی، دیفتری و سل از سیر استفاده می‌شد. در بین ترکیبات سیر اثر ضد باکتری آلیسین قابل توجه است و حتی در رقتهای یک صد هزارم تأثیر مهاری بر رشد باکتریهای گرم منفی و مثبت مثل استرپتوکوکها، استافیلوکوکها و ویبریوکلرا داشته است (۹). خواص ضد باکتریهایی قوی در مورد سویه‌های

*عضو هیأت علمی گروه ایمونولوژی - دانشکده پزشکی:دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله«عج» - صندوق پستی ۵۴۶-۱۹۹۴۵، تلفن: ۸۰۵۳۷۶۹، فاکس: ۸۰۴۰۱۰۶، (مؤلف مسئول).

✧✧عضو هیأت علمی گروه انگل‌شناسی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله«عج».

**عضو هیأت علمی گروه فارماکولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله«عج».

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Tuesday September 5th 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Tuesday September 5th 2017

مقاوم شیگلا نیز گزارش شده است (۱۶). سیر همچنین همواره درمان موفقی برای بیماری مهلک مننژیت قارچی بوده است (۷).

بعضی از ترکیبات سیر مثل آلیسین آلیل متیل تیو سولفینات دارای خاصیت ضد ویروسی بوده که این خاصیت آن را به دلیل ممانعت از جذب یا نفوذ ویروس دانسته‌اند (۱۵). مدارکی دال بر تأثیر درمانی عصاره سیر بر بعضی از بیماریهای انگلی مثل همینولپیس نانا و بیماری ژیاردیازیس گزارش شده است (۶). Andrew و همکاران در سال ۱۹۹۶ تأثیر آلیوم ساتیوم (یکی از ترکیبات آلی عصاره سیر) را در موشهای آلوده به تریپانوزوم مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که این عصاره به میزان ۵ میلی گرم در میلی لیتر قادر است بیماریزایی انگل را سرکوب نماید (۱).

مطالعاتی نیز در سالهای اخیر بر روی اثرات عصاره سیر بر زخم لیشمانیوز شده است. محققین تأثیر آن بر انگل لیشمانیا را از طریق تقویت سیستم ایمنی می‌دانند. دکتر غفوریان (۱۴) نشان داده که تجویز خوراکی سیر به حیوان باعث افزایش ایمنی سلولی می‌گردد. دکتر غضنفری و همکاران اثر عصاره سیر بر رشد انگل لیشمانیا و بهبود زخم را مطالعه و گزارش نموده است که مکانیزم آن از طریق افزایش سایتوکاین‌های مترشحه توسط سلولهای T تایپ ۱ (Th1) صورت می‌گیرد (۱۰). مؤلف و همکاران نیز طی مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره سیر از طریق تقویت فعالیت ماکروفاژها و افزایش ترشح نیتریک اکساید باعث کاهش رشد انگل در محیط کشت می‌گردد (۲).

مواد و روشها:

تهیه عصاره سیر:

مقدار ۵۰۰ گرم سیر همدان را پس از جدا کردن پوست آن به مدت یک شب در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس با چاقو شکافی در آن ایجاد گردید. مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و در آسیاب مخلوط شد. با استفاده از پارچه استریل عصاره به دست آمده از تفاله جدا گردیده و حجم نهایی آن به ۱۳۰ میلی‌لیتر رسید.

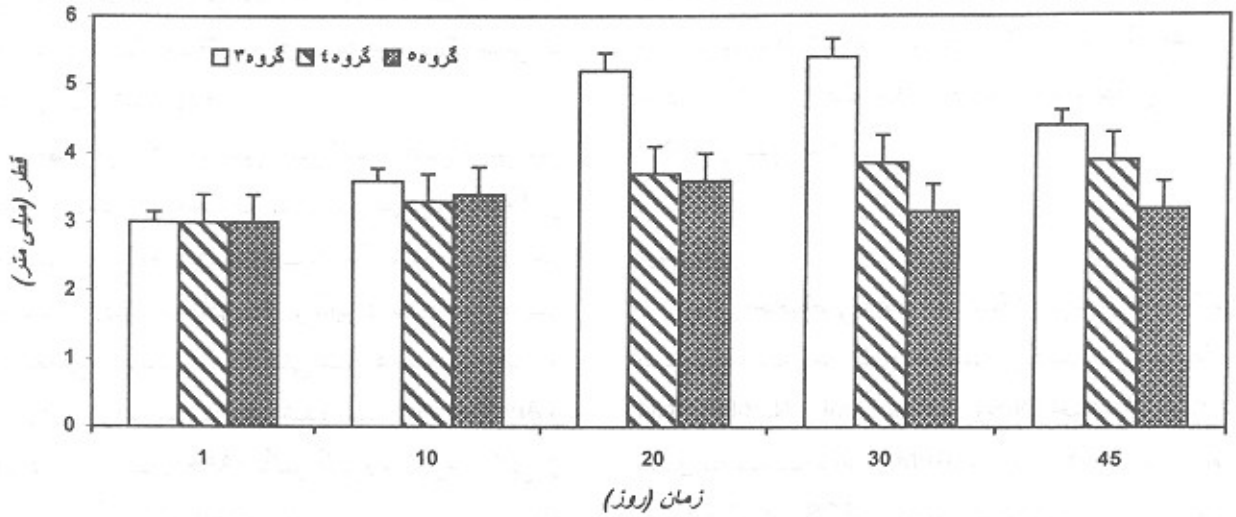
تهیه انگل:

سوش اختصاصی انگل از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و پس از کشت در محیط NNN (Novy - Mac Neal - Nicolle) جهت پاساژهای بعدی به محیط RPMI 1640 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FCS) و مقدار مناسب آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سیلین اضافه گردید. پس از رشد و تکثیر و به دست آوردن تعداد کافی انگل جهت تزریق به موش شمارش شدند. سوسپانسیونی حاوی تعداد 1×10^{6} انگل در هر میلی لیتر تهیه و مقدار 1×10^{5} انگل در حجم یک دهم میلی لیتر در زیر جلد در انتهای قاعده دم هر موش تزریق گردید. بدین ترتیب ۴۲ سر موش با ۸ هفته سن خریداری شده از انستیتو تحقیقات رازی کرج با انگل فوق آلوده گردیدند.

درمان:

پس از بالا آمدن زخم قطر آن اندازه‌گیری و موشها در ۷ گروه ۶ تایی تقسیم گردیدند. گروه اول گروه شاهد بدون درمان، گروه دوم گروه استاندارد تحت درمان با گلوکانتیم به مدت ۲۰ روز، گروه سوم درمان با عصاره سیر به مدت ۱۰ روز، گروه چهارم درمان با عصاره سیر به مدت ۲۰ روز، گروه پنجم گروه درمان با عصاره سیر به مدت ۳۰ روز، گروه ششم ابتدا به مدت ۱۰ روز به صورت موضعی تحت درمان با پماد ویتامین A بوده و سپس به مدت ۳۰ روز به صورت موضعی از عصاره سیر استفاده گردید، گروه ۷ به مدت ۴۰ روز تحت درمان با پماد ویتامین A قرار گرفت. قطر زخم در روزهای ۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ روز اندازه‌گیری و مورد تجزیه و تحلیل

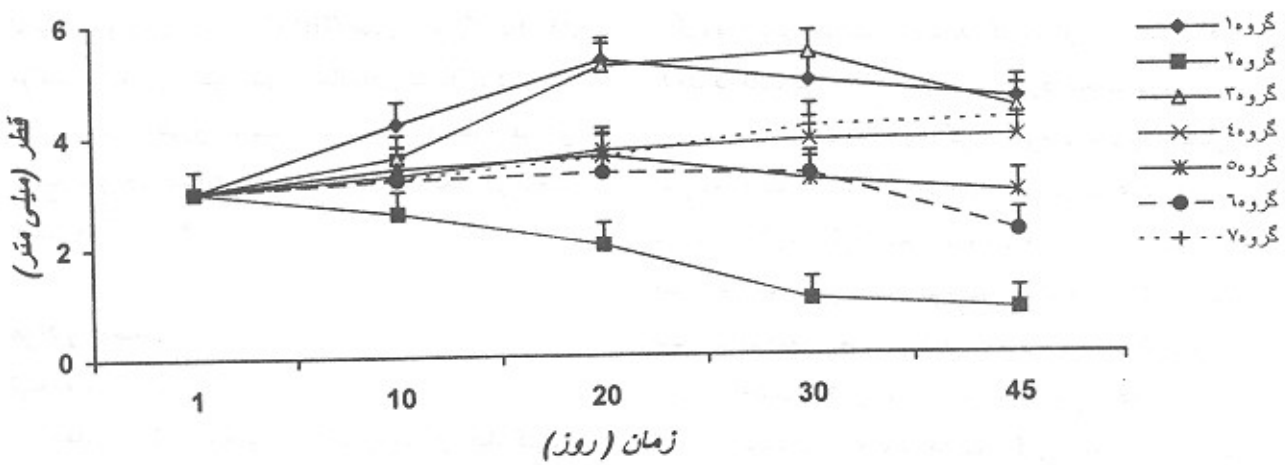
Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Tuesday September 5th 2017



نمودار شماره ۱: *اثر درمانی عصاره سیر در زمانهای مختلف.*

آماری قرار گرفت. از تمامی زخمها نمونه گیری به عمل آمده و وجود انگل در زخم و همچنین آلودگی میکروبی مورد بررسی قرار گرفت.

در یک تجربه مجزا به منظور اندازه‌گیری مقدار نیتریک‌اکساید ۷ گروه ۶ تایی موش شبیه فوق تحت درمان قرار گرفتند. پس از زمانهای مشخص ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ روز موشها کشته و ماکروفاژهای صفاقی آنها به دست آمد (۱). برای این کار مقدار ۵ میلی لیتر PBS (Phosphate - Buffer - Salin) سرد، را به وسیله سرنگ به داخل صفاق موش تزریق کرده و پس از چند دقیقه ماساژ مایع صفاقی خارج گردید. پس از سانتریفوژ و ۳ بار شستشو با PBS سرد سلولها شمارش و



نمودار شماره ۲: *مقایسه گروههای ۷گانه در زمانهای مختلف.*

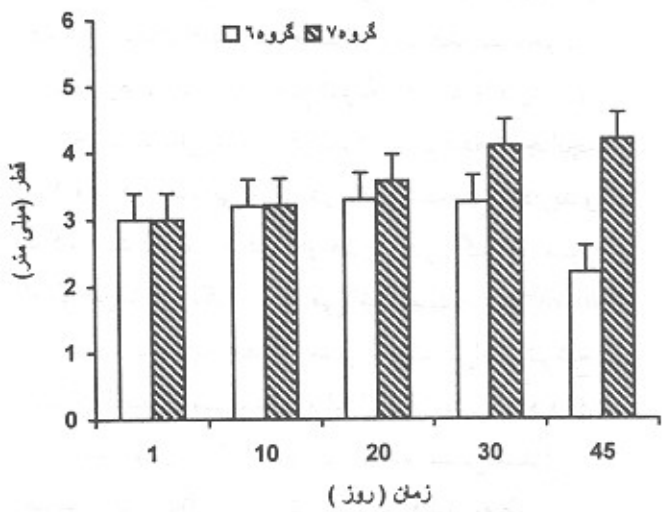
Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Tuesday September 5th 2017

سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سلولها در محیط کشت بدون فنول رد به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 در هوا انکوبه شدند. پس از مدت مذکور با PBS گرم سطح پلیتها شسته و بدین وسیله سلولهای آزاد موجود در سطح پلیت (سلولهای غیر چسبنده) یعنی سلولهای غیر ماکروفاژی به آرامی خارج گردیدند. ماکروفاژها در محیط کشت بدون فنول رد به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 در هوا انکوبه شدند. مقدار نیتریت موجود در مایع رویی به عنوان اندیکاتوری از نیتریک‌اکساید به روش گریس (Greiss) اندازه‌گیری شد (۱). نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری Chi-Square مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

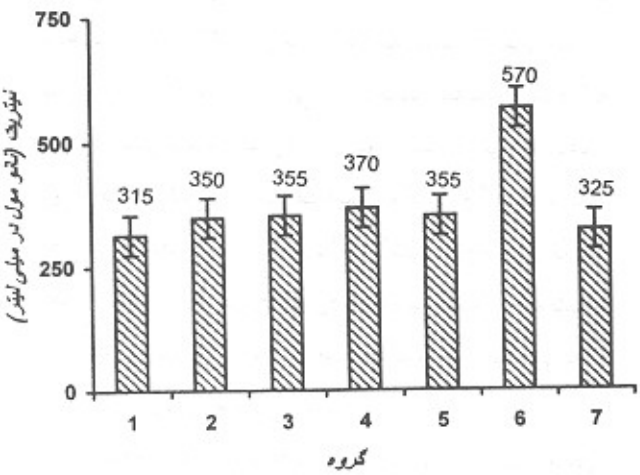
نتایج:

نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره سیر به مدت ۱۰ روز درمان قادر به توقف گسترش زخم نبود به طوری که قطر زخم در روز دهم از ۳ میلی متر در روز اول به ۳/۶ میلی متر در روز دهم رسید (نمودار شماره ۱). در حالی که در گروه ۴ و ۵ از گسترش زخم در روز بیستم جلوگیری شده بود ولی در گروه سوم که درمان پس از ۱۰ روز متوقف گردید گسترش زخم رو به افزایش و قطر آن به ۵/۲ میلی متر رسیده است. این در حالی است که قطر زخم در گروههای ۴ و ۵ در روز بیستم به ترتیب ۳/۷ و ۳/۶ افزایش یافته بود. مقایسه قطر زخم در گروهها نشان می‌دهد که در روز ۳۰ام قطر زخم در گروههای ۴ و ۵ مهار و به ترتیب به ۳/۳ و ۳/۱ میلی متر رسیده است در حالی که در گروه ۳ (۱۰ روز درمان) قطر زخم در روز ۳۰ام برابر با ۵/۴ میلی‌متر بود (نمودار شماره ۲). نمودار شماره ۳ نشان می‌دهد که استفاده موضعی از پماد ویتامین A به مدت ۱۰ روز قبل از استعمال ۳۰ روزه عصاره آبی باعث بهبود و کنترل زخم گردیده است ولی پماد ویتامین A به تنهایی در مدت ۴۰ روز درمان در مقایسه با گروه شاهد نتوانسته است که زخم را کنترل نماید.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی به دست آمده از موشهای مورد آزمایش پس از تحریک با لیپوپلی‌ساکارید نشان داد که (نمودار شماره ۴) مقدار نیتریت در گروه اول برابر با ۳۱۵ نانومول در هر میلی‌لیتر بود. در حالی که مقدار آن



نمودار شماره ۳: *مقایسه اثر ویتامین A (۷) و ترکیب ویتامین A و عصاره سیر (۶).*



نمودار شماره ۴: *نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی موش (نیتریت به عنوان اندیکاتور NO).*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Tuesday September 5th 2017

در گروه استاندارد برابر با ۳۵۰، در گروه ۱۰ روز درمان ۳۵۵، در گروه ۲۰ روز درمان ۳۷۰، در گروه ۳۰ روز درمان برابر با ۳۵۵ نانومول در هر میلی لیتر بود که این تفاوت در مقایسه با گروه اول معنی‌دار می‌باشد ($P<0/05$). مقدار نیتریت مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی به دست آمده از گروه تحت درمان با پماد ویتامین A و عصاره سیر برابر با ۵۷۰ نانومول در چاهک بود که نشان دهنده اثر مضاعف پماد ویتامین A و عصاره سیر بر ترشح نیتریک‌اکساید می‌باشد در حالی که در گروه ۷ وقتی که پماد ویتامین A تنها استفاده شد مقدار ترشح نیتریک‌اکساید آن ۳۲۵ نانومول بود که تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت.

بحث:

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که درمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز با عصاره سیر توانایی کنترل زخم لیشمانیایی را دارد ولی رضایت‌بخش نیست. با توجه به اینکه عدم نتیجه مطلوب طی ۳۰ روز درمان می‌تواند به دلیل عدم نفوذ سیر در زخم باشد از پماد ویتامین A به صورت موضعی استفاده شد تا این که عصاره سیر بتواند به زخم نفوذ یابد. نتایج حاصل از ترکیب توام پماد ویتامین A با عصاره سیر نشان داد که رضایت‌بخش نبودن نتایج با درمان ۳۰ روز می‌تواند به دلیل عدم جذب عصاره سیر باشد. لذا می‌توان چنین تفسیر نمود که عصاره سیر بهبود فوری زخم لیشمانیایی را باعث نمی‌گردد و دلیل آن هم ماهیت مکانیزم کشته شدن انگل می‌باشد. زخم لیشمانیایی ناشی از وجود و تکثیر انگل است. از طرفی فاکتورهای تعیین کننده عفونتهای لیشمانیایی انسانی کاملاً روشن نیستند هر چند می‌توان آنرا به القاء ایمنی سلولی نسبت داد.

درک فعلی ما از پاسخهای ایمنی در لیشمانیوز متکی به نتایج به دست آمده از مدلهای حیوانی به ویژه عفونت لیشمانیا ماژور در موش می‌باشد (۸). کنترل مؤثر عفونتهای لیشمانیایی در انسان و موش از طریق فعال سازی مکانیزمهای متعدد اختصاصی و غیر اختصاصی ماکروفاژها صورت می‌گیرد. تولید و ترشح نیتریک‌اکساید یکی از عوامل مؤثر در این فرآیند می‌باشد (۱). تولید نیتریک‌اکساید با مکانیزمهای حفاظتی بر ضد لیشمانیا و پاتوژنهای داخل سلولی دیگر ارتباط دارد. در این مطالعه نتایج نشان داد که بین نیتریک‌اکساید مترشحه توسط ماکروفاژها و بهبود زخم در گروههای تحت درمان با عصاره سیر در زمانهای مختلف و استعمال پماد ویتامین A در مقایسه با گروه شاهد و استاندارد تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P<0/05$). در حالی که مقدار نیتریک‌اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای موشهای تحت درمان با پماد ویتامین A و عصاره سیر در مقایسه با گروه شاهد بسیار بالا است (۷۸/۱۲٪ افزایش) در گروه استاندارد مقدار نیتریک‌اکساید فقط ۱۰/۹۳ درصد افزایش داشته است.

این نتایج نشان می‌دهد که کنترل زخم توسط عصاره سیر احتمالاً از طریق افزایش ترشح نیتریک‌اکساید صورت گرفته در حالی که گلوکانتیم به طور مستقیم و مستقل از نیتریک‌اکساید باعث بهبودی زخم لیشمانیوز گردیده است. در این رابطه تجربیات قبلی احمدی و همکاران نشان داده که عصاره سیر قدرت تحریک ماکروفاژها و افزایش ترشح نیتریک‌اکساید را دارد (۹).

تجربیات قبلی ما و دیگران (۴) نشان داده که چنانچه ماکروفاژهای صفاقی موش در حضور لیپوپلی‌ساکارید و یا گاما اینترفرون یا ترکیبی از هر دو قرار گیرند، منبع اصلی تولید نیتریک‌اکساید می‌باشد. مطالعات *In vivo* نیز نشان داده که عصاره سیر باعث افزایش ترشح سایتوکاینهای مربوط به Th2، Th1 می‌گردد (۱). سایتوکاینهای Th1 را تقویت کننده ایمنی سلولی و سایتوکاینهای Th2 را مهار کننده آن می‌دانند. به طور مثال تجربه قبلی ما نشان داده که اینترلوکین ۶ باعث مهار ترشح نیتریک‌اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Tuesday September 5th 2017

می‌گردد (۲). به عبارتی عصاره سیر می‌تواند در داخل بدن از طریق تحریک لنفوسیتهای T و ترشح سایتوکاینهای مربوطه باعث افزایش فعالیت ماکروفاژها شده و هم می‌تواند احتمالاً به طور مستقیم باعث تحریک ماکروفاژها گردد. در هر دو صورت نتیجه حاصله عبارت از افزایش سطح نیتریک‌اکساید می‌باشد.

در این رابطه غفوریان (۳) نشان داده که تجویز خوراکی سیر به حیوان باعث افزایش سطح ایمنی سلول می‌گردد. لذا با درک فعلی ما از مکانیزم ایمنی سلولی و ماکروفاژها به نظر می‌رسد که تجویز موضعی عصاره سیر در این تحقیق به کندی جذب شده لذا قدرت تحریک فوری سلولهای T و ماکروفاژها را نداشته و می‌تواند یکی از دلایل طولانی شدن بهبود زخم باشد.

نتیجه‌گیری:

پس از قابل نفوذ شدن زخم در اثر استفاده موضعی از پماد ویتامین A عصاره سیر در طی درمانی ۳۰ روزه قادر است از گسترش زخم لیشمانیور پوستی جلوگیری و باعث بهبودی زخم گردد و این بهبودی احتمالاً مرهون افزایش تولید نیتریک‌اکساید می‌باشد. لذا ترکیب توأم ویتامین A با عصاره سیر با فرمول و پایه مناسب جهت تحقیق در مدل انسانی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی:

از کلیه کسانی که با ما در این طرح همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

۱- احمدی کاظم؛ پندونه علی؛ اصفهانی علی‌اکبر. اثر عصاره سیر بر ترشح نیتریک‌اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش. مجله علوم پایه پزشکی ایران، ۳(۲): ۶۰-۵۶، ۱۳۷۹.

۲- احمدی کاظم. نقش تنظیمی هورمون ۵-آلفا دی‌هیدروتستوسترون بر ترشح اینترلوکین ۱و۶. مجله پزشکی کوثر، ۲(۴): ۳۷-۲۲۹، ۱۳۷۶.

۳- غفوریان مهری. مطالعه اثرات ایمونولوژیکی و هیستولوژیکی سیر. پنجمین کنگره ایمونولوژی ایران. دانشگاه تربیت مدرس، ۱۲۷، ۱۳۷۹.

4- Ahmadi Renani K.; McCruden AB. Sex differences in macrophage nitric oxide production. Iranian Journal of Medical Sciences, 23(1-2): 42-7, 1998.

5- Andrew N.; Williams S. Allium sativum - induced death of african trypanosmes. Parasitol Res, 82: 634-7, 1996.

6- Block E. The organosulfur chemistry of the genus allium implications for the organic chemistry of sulfur. Angew, Chem Int Ed Eng, 31(9): 1135-78, 1992.

7- Buates S.; Matlashewski G. Treatment of experimental Leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: Efficacy and mode of action. J Infect Dis, 179(6): 1485-90, 1999.

8- Bogdan C. Leishmaniasis: Principles of the immune response and function of nitric oxide. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 111(11-12): 409-14, 1998.

9- Chowdhury Ak.; Ahsan M.; Islam SN.; Ahmed ZU. Efficacy of aqueous extract of garlic & allicin in experimental Shigellosis in rabbits. Indian J Med Res, 93: 33-6, 1991.

10- Desijeu P. Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. World Health Star, 45(2-3): 267-75, 1992.

11- Elshami MA. Antifungal property of garlic clore juice compared with fungicidal treatments against fusarium. Egyption J Phytopathology, 17(1): 55-62, 1987.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Tuesday September 5th 2017

12- Ghazanfari T.; Hassan ZM.; Ebtekar M.; Ahmadian A.; et al. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major* infected Balb\c mice. Scand J.Immunol, 52(5): 491-95, 2000.

13- Green S.; Nacy C.; Meltzer M. Cytokine - induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. J Leuko Biol, 50: 93-103, 1991.

14- Vouldoukis I.; Riveros-Moreno V.; Dugas B.; Becherel P. The killing of *Leishmania major* by macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon R11/CD23 surface antigen. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 78048-55, 1995.

15- Vouldoukis I.; Becherel P.; Riveros-Mareno V.; Dugas B. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of lieshmania infantum and *Leishmnia major* by human macrophages by decreased nitric oxide generation. Eur J Immunol, 27: 8605-9, 1997.

16- Weber ND.; Anderson DO. *In vitro* virucidal effects of Allium sativum (garlic extract and compounds). Planta Med, 58: 417-23, 1992.