

اثر عصاره سیر بر میزان اینترلوکین-۱۲ و اینترلوکین-۱۰ حاصل از ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور

فرشته فانی^۱، محمد جواد غروی^۲، ملیحه نوبخت^۳، معصومه بخشایش^۴، شهرام خادم وطن^۵

^۱ دانشجوی داروسازی، مؤسسه مطالعات تاریخ پزشکی، طب اسلامی و مکمل دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، تهران، ایران.
^۲ دانشیار انگل‌شناسی، مؤسسه مطالعات تاریخ پزشکی، طب اسلامی و مکمل دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۳ دانشیار انگل‌شناسی، مؤسسه مطالعات تاریخ پزشکی، طب اسلامی و مکمل، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۴ مربی انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۵ استادیار انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوزیس، بیماری است که به وسیله چندین گونه از تک‌یاخته‌های جنس لیشمانیا ایجاد می‌گردد. سیر نیز به‌عنوان یک عامل درمانی، جزء معمول‌ترین گیاهان مرسوم در پزشکی محسوب می‌شود. این مطالعه با هدف، بررسی اثر عصاره سیر در افزایش سیتوکین‌های اینترلوکین-۱۰ و اینترلوکین-۱۲ در محیط کشت از طریق ماکروفاژها برای دریافت و تخریب لیشمانیا صورت گرفت.

روش بررسی: بعد از پرولیفراسیون ماکروفاژها در محیط کشت و انکوباسیون با لیشمانیا طی مدت ۷۲ ساعت، عصاره آبی سیر با دوزهای ۱۴۸، ۳۷، ۱۸، ۹، ۲۵، ۱۸، ۵، ۳۷، ۷۴، ۱۴۸ $\mu\text{g/ml}$ به مدت ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت اضافه گردید. به‌منظور آزمون مصونیت عصاره‌ها و سلول‌های J744 تیمار شده عصاره و میزان زنده بودن سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو، تست MTT انجام شد. سپس میزان ترشح اینترلوکین‌های-۱۰ و ۱۲ از ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا توسط تست ELISA ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، استفاده از عصاره سیر با دوز ۳۷ $\mu\text{g/ml}$ به مدت ۴۸ ساعت، باعث گردید که ماکروفاژها با ترشح اینترلوکین ۱۲، پروماستیگوت‌های موجود را تخریب کنند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد اینترلوکین-۱۲ برای دفاع در مقابل پاتوژن‌های انگلی، کاربرد قطعی دارد. همچنین استفاده از اینترلوکین-۱۲ در مقابل حمله انگل لیشمانیا، یک پاسخ ایمنی قطعی محسوب می‌شود.

کلید واژه‌ها: لیشمانیای ماژور؛ سیر؛ اینترلوکین-۱۰؛ اینترلوکین-۱۲؛ ماکروفاژها.

نویسنده مسئول مکاتبات: مؤسسه مطالعات تاریخ پزشکی، طب اسلامی و مکمل، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشکده پزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: manob@iums.ac.ir

تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۵۸۶۸۹

تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۲۶

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۵

مقدمه

برای مدت‌های مدید از چندماه تا چند سال باقی می‌مانند و علاوه بر ایجاد زخم‌ها و عفونت‌های باکتریایی ثانویه، موجب ایجاد بدشکلی و اسکار روی نقاط مختلف بدن به‌خصوص صورت می‌شوند. درمان رایج جهت لیشمانیوز پوستی ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌مان می‌باشد که اغلب توکسیک بوده و منجر به آسیب قلب، کبد، پانکراس و بافت‌های خون‌سازی می‌شود (۲-۴). به‌علاوه، دوره طولانی درمان،

لیشمانیوز یک بیماری عفونی زئونوتیک است که توسط انگل‌های تک‌یاخته‌ای متعلق به جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. در حال حاضر حدود ۱۲ میلیون نفر از مردم جهان به این بیماری مبتلا بوده و سالانه ۲ میلیون مورد جدید از بیماری گزارش می‌شود که ۱/۵ میلیون آن از نوع جلدی است (۱). زخم‌های ایجادشده از نوع پوستی یا سالک

سایتوکاین‌های مهاری با ایجاد مکانیسم‌های متعادل کننده، عمل می‌کنند. اینترلوکین-۴، اینترلوکین-۱۰ و اینترلوکین-۱۳ توانایی مهار پاسخ سلول‌های Th1 و مهار فعال شدن مجدد ماکروفاژها را دارند. بنابراین در ترمیم بافت دخالت نموده، اما عفونت داخل سلولی را تقویت می‌کنند (۸). سیر دارای فعالیت ضد انگلی قوی است. در گزارشاتی نیز تأثیر درمانی عصاره آبی سیر بر هیمنولیس نانا و ژیا ردیا نشان داده شده است (۱۲). از دیگر اثرات سیر مهار رشد لیشمانیای ماژور است. در یک مطالعه، اثر غلظت‌های (۲۵۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰) عصاره سیر در محیط کشت بر روی 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. در یک تحقیق دیگر نیز گزارش گردید که فراکشن R10 سیر دارای خاصیت ایمنومدولانوری است که یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون می‌باشد و در درمان زخم‌های ناشی از سالک مؤثر است. در مطالعه حاضر نیز تأثیر سیر بر افزایش سایتوکاین $INF\gamma$ و فعال شدن نیتریک اکسید سینتاز القایی (Inducible Nitric Oxide Synthase) به اثبات رسید. تحقیقات نشان داده‌اند اثرات ایمنومدولانوری سیر شامل تقویت پاسخ‌های سلولی و افزایش ازدیاد حساسیت تأخیری، تمایل پاسخ‌های سایتوکاینی به سمت Th_1 در مدل لیشمانیوز، افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی در مقابل تومور، افزایش ماکروفاژ و تقویت بلع و هضم انگل لیشمانیا ماژور می‌باشد (۱۳). هدف مطالعه حاضر، تعیین اثر سیر بر میزان سایتوکاین‌هایی چون اینترلوکین-۱۰ و اینترلوکین-۱۲ در ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا ماژور بوده است که در این راستا، به بررسی تعیین میزان C50 با روش MTT، تعیین تأثیر عصاره سیر بر میزان ترشح سایتوکاین-۱۰ از سلول‌های آلوده به لیشمانیا ماژور و تعیین تأثیر عصاره سیر بر میزان ترشح سایتوکاین اینترلوکین-۱۲ از سلول‌های آلوده به لیشمانیا ماژور پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه از رده سلولی J774 سلول‌های (۱۴) ماکروفاژ مشتق از موش نژاد BALB/C، که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده گردید. این سلول‌ها در محیط RPMI 1640 رشد

درد فراوان و دیگر مشکلات، 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 سلول‌های Th_1 است. این سلول‌ها با فعال کردن ماکروفاژها، موجب ترشح مقدار زیادی از سایتوکاین‌هایی می‌شوند که در افزایش فعالیت ایمنی سلولی 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 دارد. لذا در ابتدا برای ایجاد یک عفونت اولیه، پروماستیگوت‌ها به آرامی وارد ماکروفاژها می‌شوند؛ تا با فرار از پاسخ‌های ایمنی میزبان، بسته به وجود ماکروفاژهای ساکن، عفونت داخل سلولی (اماستیگوت‌ها) را مجدداً فعال کنند (۵)، که در همان زمان پاسخ‌های ایمنی میزبان با مکانیسم‌های ایمنی غیراختصاصی (ذاتی) و ایمنی اکتسابی (ایمنی سلولی و حساسیت تأخیری) به این واکنش پاسخ می‌دهند، و تحت شرایط مطلوب ماکروفاژها به‌طور گسترده فعالیت نابودسازی لیشمانیا را تحت هدایت پاسخ سلول‌های T-Helper به انجام می‌رسانند (۹-۶). منبع تولید اینترلوکین-۱۲، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می‌باشند و روند فعال شدن مجدد ماکروفاژها بدین صورت:

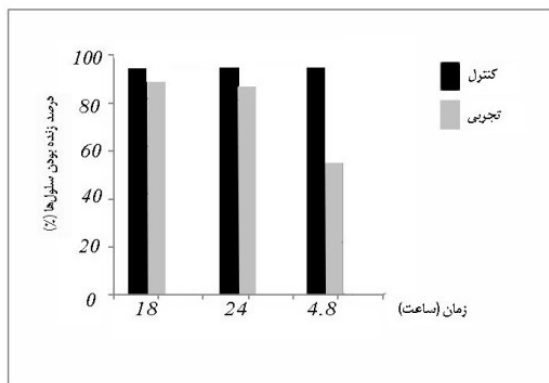
$IFN \gamma \rightarrow$ انرژی $Th_1, NK \rightarrow$ اینترلوکین-۱۲ \rightarrow

ماکروفاژ را پیش برده و در نهایت بیگانه‌خواری رخ می‌دهد. اینترلوکین-۱۲ تولید شده توسط ماکروفاژها از طریق اثر بر Th_1 در ایمنی اکتسابی و با اثر بر NK (Natural Killers) در ایمنی ذاتی نقش ایفا می‌کند، در نهایت با تحریک ترشح $IFN \gamma$ باعث فعال شدن مجدد ماکروفاژها می‌شود. لmfوسیت‌های T به ۲ شاخه تحریکی و مهاری تقسیم می‌شوند که Th_2 رده مهاری و Th_1 رده تحریکی می‌باشد. Th_2 Cell شامل: $TGF-\beta$ ، اینترلوکین-۴ اینترلوکین-۵، اینترلوکین-۱۰ و اینترلوکین-۱۳ بوده و Th_1 Cell شامل: $TNF, IFN \gamma$ ، اینترلوکین-۱، اینترلوکین-۲، اینترلوکین-۱۲ می‌باشد. مکانیسم ذاتی خصوصاً ترشح اینترلوکین-۱۲ کمک به القای ایمنی سلولی می‌کند. پاسخ‌های Th_1 با اینترفرون گاما که منجر به فعال شدن ماکروفاژها می‌شود؛ بیانگر پاسخ اینترلوکین-۱۲ است، همچنین اینترلوکین-۲ و TNF و سایتوکاین‌های دیگر نیز مشارکت می‌کنند (۶، ۱۰، ۱۱). در اثر التهاب ناشی از لیشمانیوز،

آنتی اینترلوکین ها پوشیده شده است، که با قرار گرفتن در معرض نمونه استاندارد و در ادامه اتصال بیوتین و استرپتاویدین (Streptavidin Biotin) و در نهایت تشکیل کمپلکس رنگی، جذب آنها در طول موج ۴۵۰nm دستگاه ELISA خوانده می شود. نتایج با استفاده از آزمون تی تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی داری اختلافها ($p < 0/05$) در نظر گرفته شد.

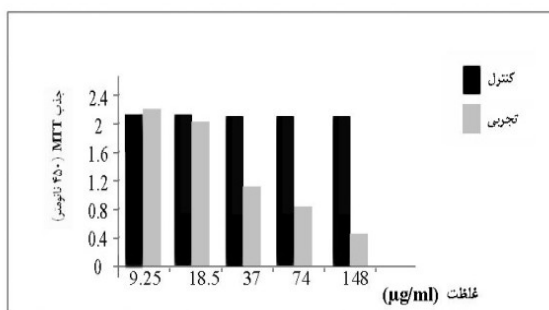
یافته ها

در نمودار ذیل نتایج به دست آمده از سنجش MTT در زمان های ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت که برای هر کدام از سلول ها گروه کنترل در نظر گرفته شده است، بیانگر این می باشد که در گروه ۴۸ ساعت توان حیاتی سلول های تحت تیمار با سیر (نمودار تیره) نسبت به گروه کنترل (نمودار روشن) کاهش معنی داری را با ($p < 0/05$) نشان می دهد.



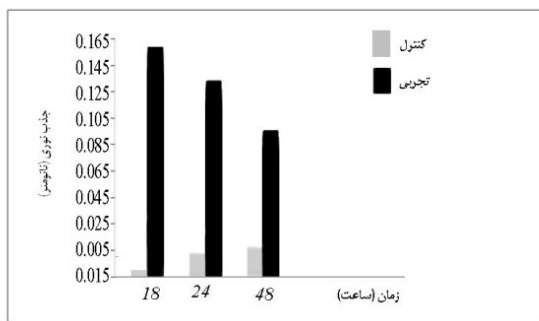
نمودار شماره ۱: نتایج حاصل از سنجش MTT در سلول های ماکروفاژ در زمان های ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل

نمودار شماره ۲، بیانگر مقایسه نمونه های آلوده با انگل و تیمار شده با غلظت های مختلف سیر (نمودار تیره) نسبت به گروه کنترل (نمودار روشن) با سطح معنی داری ($p < 0/05$) می باشد.



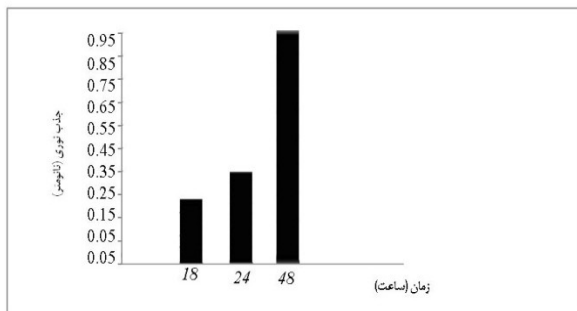
نمودار شماره ۲: نتایج حاصل از سنجش MTT در سلول های ماکروفاژ در غلظت های (۹/۲۵، ۱۸/۵، ۳۷، ۷۴، ۱۴۸µg/ml) عصاره سیر در مقایسه با گروه کنترل

می یابند و این محیط به عنوان محیط پایه، دارای اسید آمینه، گلوکز، نمک ها و ویتامین های مختلف می باشد. برای کامل کردن این محیط، به آن سرم گاوی ۱۰٪ (FBS) و آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین نیز اضافه شد. برای تحمل تغییرات pH در این محیط از بافر بی کربنات استفاده گردید و سلول ها در فلاسک های ۵۰ml در دمای ۳۷°C و فشار ۵٪ CO₂ کشت داده شدند. پس از اینکه سلول ها کف ظرف را کاملاً پر کردند، از کف ظرف جدا شده و به ظرف دیگر منتقل شدند، سپس به نسبت ۱ واحد سلول، ۵ واحد انگل اضافه گردید، و در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند؛ تا انگل وارد ماکروفاژ شود. ماکروفاژهای آلوده با انگل پس از جداسازی از فلاسک به وسیله محیط کشت RPMI سرد به نسبت ۱ به ۱ با آلبومین ۵٪ مخلوط شده و اسمیر بر روی لام تهیه شد. بعد از خشک شدن اسمیر با متانول فرآیند ثابت سازی انجام گردید، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شد. پس از زمان ۲۰ دقیقه لام با آب شسته شده و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده گردید. سلول های ماکروفاژی کشت داده شده در فلاسک به وسیله محیط کشت RPMI 1640 سرد جدا شده و در پلیت های ۹۶ خانه ای در هر ۵۰۰۰well سلول ماکروفاژ ریخته شدند. انگل لیشمانیایی کشت داده شده نیز بعد از ۲ ساعت برای چسبیدن سلول های ماکروفاژ، به نسبت ۵ برابر سلول های ماکروفاژ، انگل اضافه شد. از این رو تست MTT بر روی ۵ غلظت از عصاره سیر به ترتیب: ۱۴۸µg/ml، ۷۴، ۳۷، ۱۸/۵، ۹/۲۵) انجام شد. پس از گذشت زمان های ۱۸، ۲۴، ۴۸ ساعت پلیت ها را به رنگ MTT آغشته نموده و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷°C، ۵٪ CO₂ و DMSO افزوده شد، پس از نیم ساعت OD ها با Elisa Reader خوانده شدند. در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت سوپ ماکروفاژهای بدون انگل و بدون سیر، در زمان های ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت سوپ ماکروفاژهای آلوده با انگل بدون سیر و ماکروفاژهای آلوده با انگل و تیمار شده با سیر را داخل ویال های ۱/۵ml ریخته و در ۸۰°C فریز شدند؛ تا برای مراحل بعدی آزمایشات استفاده شوند. بعد از تعیین غلظت اینترلوکین سوپ های جمع آوری شده به وسیله کیت های سنجش اینترلوکین-۱۰ و اینترلوکین-۱۲ شرکت Med Bender کالیفرنیا- امریکا، عمل آنالیز انجام شد. این روش جهت سنجش میزان کمی اینترلوکین ها به کار می رود. کیت ها برای نمونه های سرمی و سوپ های سلولی انسان، موش و میمون قابل استفاده هستند. در پیچه های کیت با



نمودار شماره ۵: نتایج حاصل از کیت اینترلوکین-۱۲ در ماکروفاژهای آلوده با انگل و نمونه‌های بلانک در زمان‌های ۱۸، ۲۴، ۴۸ ساعت

نمودار شماره ۶، مقایسه نمونه‌های تیمار شده با سیر را در ماکروفاژهای آلوده با انگل نشان می‌دهد. محور عمودی بیانگر جذب و محور افقی بیانگر زمان با $p < 0.05$ می‌باشد.



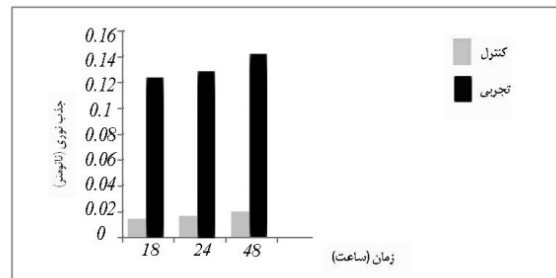
نمودار شماره ۶: نتایج حاصل از کیت اینترلوکین-۱۲ در ماکروفاژهای آلوده با انگل تیمار شده با سیر در زمان‌های ۱۸، ۲۴، ۴۸ ساعت

بحث

در سال‌های اخیر وجود مواد ایمنومدولاتور در سیر توسط محققین متعددی گزارش شده است. یافته‌ها نشان می‌دهد عصاره سیر قادر است پاسخ‌های ایمنی سلولی را تحریک نموده و باعث فعال شدن ماکروفاژها و سلول‌های NK شود (۱۶، ۱۵). با توجه به اهمیت سایتوکاین‌های حاصل از سلول در توسعه و ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و با توجه به یافته‌های فوق، نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره آبی سیر با مکانیسم افزایش اینترلوکین-۱۲ و سایتوکاین $INF\gamma$ و فعال شدن iNOS بر ایمنی سلول مؤثر می‌باشد. 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 $INF\gamma$ چه از طریق اتوکراین و یا پاراکراین، می‌توانند انگل را تخریب و یا حذف نمایند (۱۷). مطالعات متعدد In Vivo و In Vitro نشان می‌دهد که $INF\gamma$ نقش

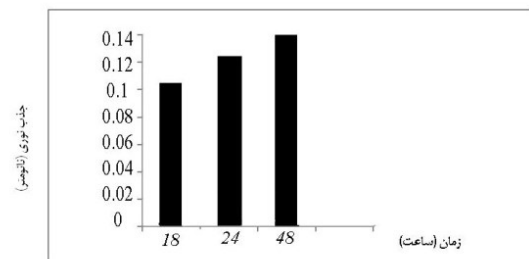
در مطالعه حاضر، پس از استفاده غلظت‌های (۱۴۸، ۷۴، ۳۷، ۱۸/۵، ۹/۲۵) عصاره آبی سیر، مشخص گردید که غلظت ۳۷ $\mu\text{g/ml}$ بهترین غلظتی است که با تأثیر بر ماکروفاژهای آلوده با لیسمانیا ماژور به مدت ۴۸ ساعت، منجر به تخریب بیش از نیمی از سلول‌ها می‌شود. بنابراین، غلظت مؤثر عصاره سیر بر انگل لیسمانیا ۳۷ $\mu\text{g/ml}$ به دست آمد. نمودار شماره ۲ نتایج حاصل را نشان می‌دهد.

نمودار ستونی زیر مقایسه تغییرات اینترلوکین-۱۰ در نمونه‌های بدون سیر در ماکروفاژهای آلوده با انگل و بدون آلودگی می‌باشد. محور عمودی بیانگر جذب و محور افقی بیانگر زمان با $(p < 0.05)$ است.



نمودار شماره ۳: نتایج حاصل از کیت اینترلوکین-۱۰ در ماکروفاژهای آلوده با انگل بدون عصاره سیر و نمونه‌های بلانک در زمان‌های ۱۸، ۲۴، ۴۸ ساعت

نمودار شماره ۴، مقایسه نمونه‌های تیمار شده با سیر را در ماکروفاژهای آلوده با انگل نشان می‌دهد. محور عمودی بیانگر جذب و محور افقی بیانگر زمان با $p < 0.05$ می‌باشد.



نمودار شماره ۴: نتایج حاصل از کیت اینترلوکین-۱۰ در ماکروفاژهای آلوده با انگل تیمار شده با سیر در زمان‌های ۱۸، ۲۴، ۴۸ ساعت

نمودار شماره ۵، مقایسه تغییرات اینترلوکین-۱۲ در نمونه‌های بدون سیر در ماکروفاژهای آلوده با انگل و بدون آلودگی است. محور عمودی بیانگر جذب و محور افقی بیانگر زمان با $p < 0.05$ می‌باشد.

بیماران شرکت کننده در مطالعه که تحت تأثیر عصاره سیر قرار گرفته بودند، ۹۰٪ موارد به درمان با عصاره سیر پاسخ مثبت نشان دادند که از این تعداد ۳۶٪ بهبودی کامل حاصل کردند و ۵۴٪ از موارد هم به بهبودی نسبی دست یافتند. همچنین Rodríguez-Villamizar و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با مطالعه اثر عصاره سیر بر رشد انگل لیشمانیا و بهبود زخم گزارش نمودند که این مکانیسم از طریق افزایش سایتوکاین‌های مترشح توسط سلول‌های Th1 صورت می‌گیرد (۲۸-۲۶). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۰ غضنفری گزارش نمود اثر عصاره سیر با افزایش INF γ از Th1 و سویچ سیستم ایمنی به سمت ایمنی سلولی صورت می‌پذیرد (۱۶). در بررسی که توسط Ohkusuk و همکارانش نیز 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 (۲۹). لذا شناسایی داروی مؤثر در درمان لیشمانیوز جلدی در تأیید روش درمان نقش به سزایی دارد. داروهای رایج نظیر گلوکانتیم، اثرات جانبی فراوانی 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 ویژه‌ای برخوردار است.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، عصاره آبی سیر با غلظت ۳۷ μ g/ml به مدت ۴۸ ساعت، با تأثیر بر ترشح اینترلوکین-۱۲ از ماکروفاژها، موجب تخریب پروماستیگوت‌های موجود در ماکروفاژ می‌شود. بنابراین اینترلوکین-۱۲ برای دفاع در مقابل پاتوژن‌های انگلی کاربرد قطعی دارد. استفاده از اینترلوکین-۱۲ در مقابل حمله انگل لیشمانیا، یک پاسخ ایمنی قطعی نیز محسوب می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پروژه از حمایت مالی مؤسسه مطالعات تاریخ پزشکی، طب اسلامی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد ۳۰۴ برخوردار بوده است. نویسندگان ضمن تشکر از مسئولین دست‌اندر کار مؤسسه، از پشتیبانی‌های علمی و اجرایی کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و بخش پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی تهران و سرکار خانم دکتر فرنوش داوودی در اجرای این طرح صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

بسیار اساسی در فعال‌سازی ماکروفاژها به‌عهد دارد. اگر ژن‌های INF γ و گیرنده آن در موش‌های مقاوم به لیشمانیا ماژور تخلیه و مهار شوند در این موش‌ها عفونت به‌صورت کشنده بروز می‌کند (۱۸، ۱۹). مطالعات In Vitro نشان داده است که اضافه شدن INF γ به ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور که از موش‌های مقاوم یا حساس جدا شده‌اند، باعث فعال‌سازی این سلول‌ها در کشتن و حذف انگل می‌شود (۲۰). در این مطالعه، به‌منظور تعیین غلظت مناسب سیر جهت تأثیر بر فعال شدن ماکروفاژها و از بین بردن انگل‌های لیشمانیا، از تست MTT استفاده گردید. نتایج نشان داد از بین غلظت‌های (۱۴۸ μ g/ml، ۷۴، ۳۷، ۱۸/۵، ۹/۲۵) بهترین غلظت از عصاره سیر که در آن نیمی از سلول‌ها تخریب می‌شوند، غلظت ۳۷ μ g/ml پس از گذشت ۴۸ ساعت تیمار شدن با عصاره سیر می‌باشد. بررسی میزان اینترلوکین‌ها نیز افزایش قابل توجه اینترلوکین-۱۲ را در مدت ۴۸ ساعت پس از افزودن عصاره سیر نشان داد. گرچه نمونه‌های حاوی عصاره سیر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، افزایش میزان اینترلوکین-۱۲ را به میزان کمتری دارند، ولی افزایش ترشح میزان اینترلوکین-۱۲ با افزودن عصاره سیر منجر به القای ایمنی سلولی می‌شود. نتایج مطالعه حاضر با انطباق بر نتایج سایر تحقیقات تأیید می‌کند عصاره سیر با افزایش ترشح INF γ و در نتیجه فعال شدن iNOS منجر به برانگیختگی مجدد ماکروفاژها می‌شود که این خود موجب فعال شدن ایمنی سلولی و در نتیجه مهار لیشمانیا ماژور می‌گردد. مطالعات فراوانی نیز در سال‌های اخیر بر روی اثرات عصاره سیر بر زخم لیشمانیوز انجام شده است (۲۱، ۲۲، ۲۳)، که محققین معتقدند تأثیر آن بر انگل لیشمانیا از طریق تقویت سیستم ایمنی صورت می‌گیرد. در مطالعه‌ای که احمدی و همکارانش در دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله ایران انجام دادند اثر عصاره سیر در بهبود زخم‌های ناشی از لیشمانیای ماژور از موش‌های آلوده از طریق افزایش نیتریک اکساید تأیید گردید که پس از آلوده کردن موش‌ها با 3×10^7 عدد پروماستیگوت، زخم ایجادشده را با عصاره سیر تیمار نمودند و قطر زخم‌ها را در روزهای اول، دهم، سی‌ام و چهل و پنجم اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد درمان ۳۰ روزه عصاره سیر باعث کاهش قطر زخم می‌شود. این محققین درمان مؤثر سیر را از طریق اثر بر افزایش نیتریک اکساید بیان کردند (۲۴، ۲۵). Unlun و همکارانش (سال ۲۰۰۷) در یک تحقیق نشان دادند سیر در درمان زخم‌های ناشی از لیشمانیای ماژور در انسان اثر مثبت واضحی دارد؛ به‌طوری‌که

References:

1. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354:1191-1199.
2. Berman JD. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clin Infect Dis* 1997;24:684-703.
3. Arevalo I, Ward B, Millrer R, Meng TC, Najar E, Matlashewski G, Llanos-Guentas A. Successful Treatment of Drug Resistant Cutaneous Leishmaniasis u=in Humans by Use of Imiquimod, an Immunomodulator. *Clin Infect Dis* 2001;33:1847-1851.
4. Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for Treating Leishmaniasis with Sodium Stibogluconate (Pentosam) and Review of Protient Clinical Studies. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:296-306.
5. Kolodziej H, Burmeister A, Wtrun W, Radtke OA, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida and Yeap Foo L. Tannins and Related Compounds Induce Nitric Oxide Synthase and Cytokines Gene Expressions in Leishmania Major-Infected Macrophage-Like RAW-264.7 Cells. *Bio Med Chem* 2005;13:2470-6476.
6. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophage Pathology and Parasite Persistence in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2004;20:524-530.
7. Sacks D, Sher A. Evasion of Innate Immunity by Parasitic Protozoa. *Nat Immunol* 2002;3:1041-1047.
8. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the Leishmania Major Paradigm of Photogenesis and Protection Hold for New World Cutaneous Leishmaniasis or the Visceral Disease? *Immunol Rev* 2004;201:206-224.
9. Gharavi MG. *Proteozology*. Teymorzadeh; 2004. p. 190-245.
10. Von Stebut E , Udey MC. Requirements for Th1-Dependent Immunity Against Infection with Leishmania Major. *Microbes Infect* 2004;6:1102-1109.
11. Murray HW. Tissue Granuloma Structure-Function in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 2001;82:249-276.
12. Soffar SA, Mokhtar GM, Evaluation of the Antiparasitic Effect of Aqueous Garlic (*Allium Sativum*) Extract in Hymenolepiasis and Giardiasis. *Y Egypt Soc Parasitol* 1991;21:497-502.
13. Edrisian GA, Rezayian M, Gorbani M, Keshavarz H, Mohebali M. *Medical Proteozology* Tehran: Tehran Medical University; 2007. p. 251-277(V₁). [Text in Persian]
14. Yuhas Y, Kaminsky E, Mor M, Ashkenazi S. Induction of Nitric Oxide Production in Mouse Macrophages by Shiga Toxin. *J Med Microbiol* 1996;45:97-102.
15. Lua BH, Yamasaki T, Gridley DS. Garlic Compounds Modulate Macrophage and T-Lymphocyte Function. *Mol Biother* 1991;3:103-107.
16. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic Induces a Shift in Cytokine Pattern in Leishmania Major-Infected BALB/c Mice. *Scand J Immunol* 2000;52:491-495.
17. Kyo E, Uda N, Kasuga S, Itakura Y. Immunomodulatory Effects of Aged Garlic Extract. *J Nutr* 2001;131:1075S-9SD.
18. Dirsch VM, Kiemer AK, Wagner H, Vollmar AM. Effect of Allicin and Ajoene, Two Compounds of Garlic, on Inducible Nitric Oxide Synthase. *Atherosclerosis* 1998;139:333-339.
19. Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, Ventorini G, Ascenzi P. Molecular Bases for the Anti Parasitic Effect of NO (Review). *Inter J Molecul Med* 2002;9:131-134.
20. Morihara N, Sumioka I, Moriguchi T, Uda N, Kyo E. Aged Garlic Extract Enhances Production of Nitrid Oxide. *Life Sci* 2002;71:509-517.
21. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souza WJ, Haddad F, Perez Mde A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, de Almeida Marzochi MC, Marzochi KB, da Costa SC. Leishmanial Antigens in the Diagnosis of Active Lesions and Ancient Scars of American Tegumentary Leishmaniasis Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(7):987-996.
22. Castellucci L, Jamieson SE, Miller EN, Menezes E, Oliveira J, Magalhães A, Guimarães LH, Lessa M, de Jesus AR, Carvalho EM, Blackwell JM. CXCR1 and SLC11A1 Polymorphisms Affect Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: A Case-Control and Family-Based Study. *BMC Med Genet* 2010;20:11:10-18.

23. Nobakht M, Shafiee M, Tabatabaee P, Rastegar T. Assessment of Tamoxifen Effects on Nitric Oxide Synthase (NOS) in Rat's Developing Hippocampus. *Iran University of Medical Science* 2009;15(59):190.
24. Ghazanfari T, Yaraee R, Farahnejad Z, Rahmati B, Hakimzadeh H. Macrophages Activation and Nitric Oxide Alterations in Mice Treated with *Pleurotus Florida*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010;32(1):47-50.
25. Nobakht M, Majidzadeh S, Fattahi M, Tabatabaeei P. Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase During Embryonic Development of the Rat Optic Vesicle. *PJBS* 2007;(7):1078-1082.
26. Unlü RE, Altun S, Ssensöz O. Leishmania Scar: A Risk Factor for the Development of Basal Cell Carcinomas. *J Craniofac Surg* 2007;18(3):708-710.
27. Del Giudice P. Milia and Cutaneous Leishmaniasis. *Br J Dermatol* 2007;156(5):1088.
28. Rodríguez-Villamizar LA, Orozco-Vargas LC, Muñoz-Mantilla G. The Basic Health Plan's Impact on Preventing Cutaneous Leishmaniasis in Rural Areas of Santander, Colombia. *Rev Salud Publica Bogota* 2006;8 Suppl 1:116-128.
29. Ohkusuk K, Yoshimoto T, Takeda K, Ogura T, Kashiwamura S, Iwakura Y, Akira S, Okamura H, Nakanishi K. Potentiality of Interleukin-18 as a Useful Reagent for Treatment and Prevention of Leishmania Major Infection. *Infect Immun* 2000;68(5):2449-2456.