

بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c تیمار شده با عصاره آبی سیر (*Allium sativum*)

مریم ربیع مقدم، حسین رضوان*، علیرضا نوریان، سحر هامون نورد

گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۳/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی یک بیماری گرمسیری و مقاوم به درمان بوده که با توجه به وجود عوارض جانبی ناشی از داروهای استاندارد، روشهای درمانی مبتنی بر ترکیبات مؤثر گیاهی گسترش یافته است. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از لیشمانیا ماژور در موش BALB/c تیمار شده با عصاره آبی سیر بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد، تعداد ۳۶ سر موش بآلب سی ماده با میانگین وزنی ۳۰ گرم به طور مساوی در ۶ گروه تقسیم بندی و سوش استاندارد انگل لیشمانیا ماژور در ۵ گروه تزریق شد. سه گروه به صورت خوراکی و موضعی تحت درمان با عصاره آبی سیر قرار گرفتند و سه گروه نیز به عنوان شاهد، کنترل بدون درمان و دریافت کننده دارو گلوکانتیم بودند. اندازه زخم در هر ۵ گروه دارای زخم به صورت هفتگی ارزیابی شد و پس از گذشت دوره ۹۰ روزه تیمار، بافت‌های پوست اطراف زخم، غده لنفی، طحال و کبد جهت ارزیابی هیستوپاتولوژیک اخذ شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس دوطرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد کاهش معنی‌دار اندازه زخم در گروه‌های دریافت کننده عصاره سیر به صورت خوراکی مشاهده شد ($p < 0.001$). ساختار ارگان‌های لنفی از لحاظ وجود التهاب، گرانولوما و تراکم لنفوسیتی در دو گروه دریافت کننده عصاره خوراکی سیر نسبت به گروه‌های کنترل و حتی گروه دریافت کننده پماد موضعی متفاوت بوده و روند بهبود ترمیم در آنها مشاهده شد، همچنین بهبود زخم در گروه دریافت کننده عصاره خوراکی سیر قبل از تزریق سوش انگل به طور معنی‌داری تسریع یافت ($p < 0.05$). تغییرات هیستوپاتولوژیک در گروه دریافت کننده پماد سیر نیز شواهدی از درمان زخم را نشان داد، ولی در پایان دوره درمان نسبت به گروه دریافت خوراکی سیر اثربخشی کمتری داشت ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: عصاره خوراکی سیر واکنش‌های التهابی در موضع زخم لیشمانیوز جلدی را به سمت ترمیم تغییر داده و روند بهبود زخم را تسریع می‌دهد. ترکیبات عصاره سیر می‌تواند به عنوان یک گزینه درمان طبیعی در عفونت مقاوم به درمان لیشمانیا در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی سیر، لیشمانیوز جلدی، هیستوپاتولوژی، موش BALB/c

* نویسنده مسئول: حسین رضوان، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی

Email: h.rezvan@basu.ac.ir

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

انگل لیشمانیا مآزور تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا بوده که بروز زخم جلدی یکی از اشکال شایع این بیماری است، شیوع این بیماری در سطح جهان و ایران به سه شکل بالینی شامل؛ لیشمانیوز جلدی - شهری، لیشمانیوز جلدی - روستایی و لیشمانیوز احشایی گزارش شده است، طبق آمار سازمان جهانی بهداشت، کشورهای ایران، سوریه، افغانستان، الجزایر، عربستان سعودی، برزیل، کلمبیا، نیکاراگوئه و پرو بیشترین درصد ابتلا را داشته (۱) و در پژوهش‌های اپیدمیولوژیک دو دهه اخیر در ایران و خاورمیانه، استان‌های خراسان، سیستان و بلوچستان، تهران، خوزستان، فارس، بوشهر، اصفهان، کرمان، یزد، ایلام، چهارمحال و بختیاری، اردبیل در ایران نیز از کانون‌های مهم ابتلا به لیشمانیوز می‌باشند (۲). محققان نشان دادند که بسیاری از گونه‌های لیشمانیا توانایی تعدیل و تضعیف پاسخ‌های سیستم ایمنی در بدن میزبان را داشته و در نتیجه باعث افزایش بقا انگل در میزبان و پیشرفت بیماری می‌شوند. عواملی چون ژنتیک میزبان، دستگاه گوارش پشه‌خاکی به عنوان ناقل و فاگولیزوزوم‌های ماکروفاژ نقش مهمی را در افزایش پاتوژنسیتیته و مقاومت انگل در بدن میزبان دارد (۳). ضایعات جلدی به شکل اریتماتوز همراه پلاک‌هایی با پوسته کم و در موارد عود کننده همراه با پلاک‌های جدید به وجود می‌آید (۴). اخیراً با توجه با ایجاد عارضه جلدی دردناک ناشی از این بیماری و فقدان درمان قطعی و

بدون عوارض ناشی از درمان، پژوهش‌ها در زمینه رایج راهکارهایی در جهت ترمیم زخم در فرم جلدی بیماری در حال انجام می‌باشد.

درمان لیشمانیوز جلدی با سه روش موضعی، سیستمیک و درمان فیزیکی (۵) از سال ۱۹۹۱ تاکنون در حال انجام می‌باشد (۶). ترکیبات آنتی‌موان اولین خط درمان برای بیماران بوده که در تعدادی از بیماران این درمان با شکست و عود ضایعه همراه است. طبق تأییدیه وزارت بهداشت و درمان بیماران مقاوم به درمان با گلوکانتیم افرادی هستند که پس از گذراندن حداقل دو دوره کامل ۲۱ روزه درمان سیستماتیک و یا حداکثر هشت هفته متوالی دارو به صورت موضعی دچار عود بیماری شده باشند. ضایعات در فرم مقاوم به شکل اریتماتوز همراه پلاک‌هایی با پوسته کم و در موارد عود همراه با پلاک‌های جدید به وجود می‌آید. با توجه به اثرات توکسیک این داروها، این شیوه‌های درمان شیمیایی منجر به بروز عوارض جانبی و امتناع بیمار از مصرف دارو به دلیل تجویز روزانه داخل وریدی یا داخل عضلانی به مدت ۳ تا ۵ هفته می‌شود. علاوه بر این، بروز مقاومت‌های دارویی و درمان ناموفق منجر به بررسی سایر روش‌های ایمن، با اثر طولانی و در دسترس شده است (۴)، اگرچه این بیماری در فرم جلدی کشنده نیست، ولی علی‌رغم درمان با داروهای موجود، ممکن است ترمیم زخم پوستی به مدت چندماه طول کشیده و موجب ایجاد اسکار گردد (۷). پیرو مقاومت‌های دارویی، هزینه بالا درمان، عدم دسترسی بیمار،

مه‌ار رشد آماس‌تی‌گوت‌های انگل در تیمار ۴۸ ساعته با عصاره سیر اشاره کرد (۱۳).

بخش پژوهشی بیماری‌های گرم‌سیری سازمان جهانی بهداشت، لیشمانیوز را در گروه اول و جز بیماری‌های نوپدید و کنترل نشده قرار داده که علی‌رغم بررسی‌های گسترده در سطح جهان، تاکنون پیشگیری و درمان مطلوبی برای موارد ابتلا وجود نداشته و موجب تمرکز موسسات پژوهشی زیادی در جهت ارائه راهکارهای پیشگیرانه و درمانی شده است، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از *لیشمانیا ماژور* در موش BALB/c تیمار شده با عصاره آبی سیر بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد، تعداد ۳۶ سر موش بالغ سب‌سی ماده با میانگین سنی ۸-۶ هفته از مرکز تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی واقع در انستیتو پاستور کرج خریداری و در حیوان‌خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، مطابق با اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بوعلی سینا در دمای ۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد، چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با دسترسی نامحدود به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات به ۶ گروه مساوی با تعداد ۶ سر موش تقسیم و به مدت ۱۲۳ روز مورد آزمایش قرار گرفتند (۱۴). گروه‌ها شامل: گروه ۱- شاهد بدون

عوارض جانبی دارویی و زیان‌های اقتصادی و روانی مطالعه در زمینه ارائه راهکار درمانی با کارایی بالا در حال افزایش است (۸). ترکیبات گیاهی مختلفی تا کنون برای درمان لیشمانیوز جلدی مورد مطالعه قرار گرفته و دارای اثربخشی مطلوبی بوده‌اند (۹). اخیراً خصوصیات ویژه در گیاهان و بررسی فراکشن‌های مؤثر آنها به عنوان جایگزینی برای درمان بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است سیر از جمله گیاهان علفی و با نام علمی *Allium sativum* و نام انگلیسی Garlic دارای ساقه‌های تقریباً بلند و جزء گیاهان دارویی شاخص بوده که سرشار از ویتامین‌های گروه B و C و نیز آنتی‌اکسیدان‌های مختلف می‌باشد، خواص دارویی این گیاه از دیرباز نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۱۰). مصرف سیر برای درمان بیماری‌های عفونی از گذشته تاکنون رواج داشته و به عنوان یک آنتی‌بیوتیک در دسترس افراد قرار داشته و حتی در اپیدمی‌های و با دیفتری و سل مورد توجه بوده است، شایان توجه است که عصاره سیر در غلظت‌های کم نیز بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارای اثر مهاری بوده است (۱۱). پژوهش‌های انجام شده گزارشاتی را مبنی بر تأثیرگذاری بهینه و مؤثر برخی از گیاهان، از جمله سیر بر پروماستیگوت‌ها و آماس‌تی‌گوت‌های انگل لیشمانیا در محیط برون‌تنی و درون‌تنی ارائه دادند، از جمله این بررسی‌ها می‌توان به افزایش بیان ژن‌های iNOS و IFN- γ در تیمار ماکروفاژهای (J774) مواجهه یافته با انگل *لیشمانیا ماژور* با عصاره سیر (۱۲) و یا

کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. جهت ایجاد زخم، پاساژ ۲ انگل به تعداد 2×10^6 در هر میلی‌لیتر فسفات بافرسالین به صورت تزریق داخل جلدی در ناحیه قاعده دم موش تزریق گردید.

بررسی اندازه زخم به صورت هفتگی در طول دوره ۹۰ روزه انجام گرفت. با استفاده از دوربین دیجیتال (کنون - ژاپن) در فاصله مشخص از موضع و به همراه معیار مشخص بر حسب میلی متر عکس برداری شد. تصاویر اخذ شده با استفاده از نرم‌افزار ImageJ تحلیل و ارزیابی گردید. در پایان دوره درمانی و پس از آسان‌کشی، بافت‌های پوست، طحال و کبد به منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی اخذ گردید.

پس از تثبیت نمونه‌ها در فرمالین بافر ده درصد، مراحل آب‌گیری بافت با استفاده از غلظت‌های افزایشی اتانول، شفاف‌سازی با گزلیول و آغشتگی با پارافین انجام شد. در مرحله بعد قالب گیری نمونه‌ها به کمک دستگاه توزیع کننده پارافین و با استفاده از قالب‌های فلزی و پارافین پاتولوژی انجام شده و سپس بلوک‌های پارافینی بوسیله دستگاه میکروتوم (لیکا RM2145) به ضخامت ۶-۵ میکرومتر برش داده شد. برش‌های بافتی حاصل بر روی لام قرار گرفته و به روش هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی گردید. بررسی و آنالیز نمونه‌های بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری (الیمپوس) مجهز به دوربین دیجیتال (کنون-ژاپن) انجام شد.

زخم و دریافت کننده عصاره خوراکی سیر، گروه ۲- کنترل دارای زخم لیشمانیا و بدون درمان، گروه ۳- تزریق 2×10^6 پروماستیگوت انگل لیشمانیا مازور در هر میلی‌لیتر فسفات بافر سالین به صورت زیر جلدی در قاعده دم و دریافت هم‌زمان عصاره سیر به صورت خوراکی با دوز (۱/۶ گرم بر هر کیلوگرم وزن) به مدت ۱۲۳ روز، گروه ۴- دارای زخم لیشمانیا و تیمار با عصاره سیر با دوز (۱/۶ گرم بر هر کیلوگرم وزن) به صورت خوراکی تا پایان دوره درمان، گروه ۵- دارای زخم لیشمانیا و دریافت کننده پماد سیر هر دو روز یکبار و گروه ۶- دارای زخم لیشمانیا و دریافت کننده داروی گلوکانتیم با دوز (۳۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن به صورت روزانه) تحت درمان قرار گرفتند.

جهت تهیه عصاره سیر، مقدار یک کیلوگرم از حبه‌های پوست کنده سیر در مخلوط کن کاملاً خرد و یک لیتر آب مقطر استریل به آن افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و به دور از نور بر روی شیکر قرار داده شد. سپس، نمونه‌ها از یک صافی (کاغذ واتمن) فیلتر و برای تغلیظ عصاره از دستگاه روتاری به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در نهایت عصاره خالص در فالكون ریخته و در دمای ۸-۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۴).

سویه استاندارد انگل لیشمانیا مازور (MRHO/IR/75/ER) از انستیتو پاستور ایران خریداری و در مرکز کشت سلول آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در محیط

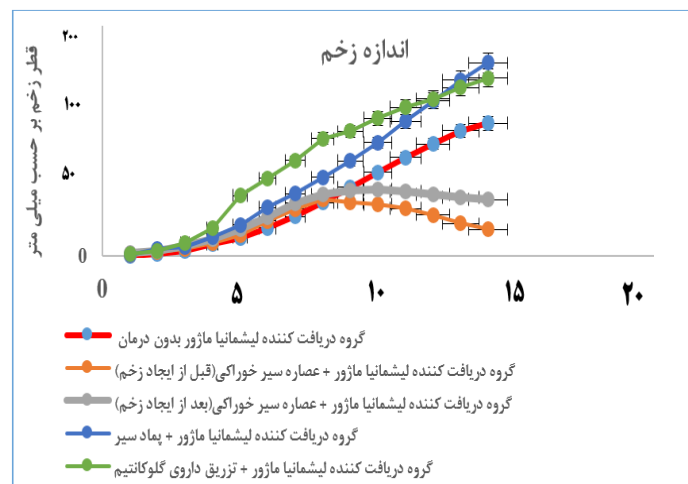
یافته‌ها

اندازه زخم در گروه‌های درمانی با عصاره سیر به صورت خوراکی نسبت به گروه کنترل زخم و دریافت کننده گلوکانتیم با افزایش طول دوره درمان کاهش معنی‌داری را نشان داد به نحوی که روند بهبود زخم لیثمانیا در گروه دریافت کننده عصاره سیر به صورت خوراکی و قبل از تزریق انگل و بروز زخم، کاهش یافته و در گروه درمانی با دارو گلوکانتیم نیز به طور معنی‌داری از هفته چهارم افزایش یافته و در گروه دریافت کننده پماد موضعی سیر نیز کاهش قابل توجهی در اندازه زخم مشاهده نشد ($p \leq 0.05$) (شکل ۱).

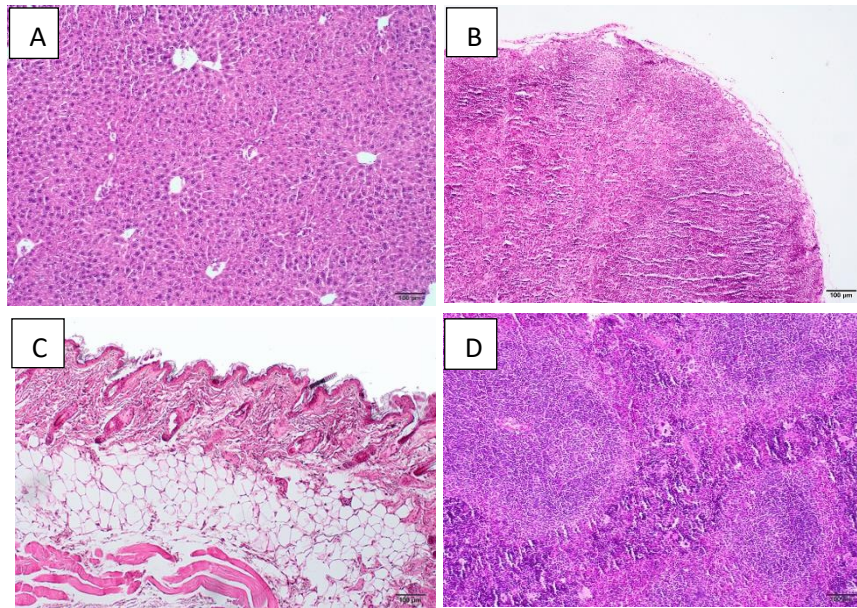
تغییرات بافتی در گروه درمانی با عصاره خوراکی سیر قبل از ایجاد زخم لیثمانیا نشان داد که میزان التهاب ناحیه درم و هیپودرم پوست نسبت به گروه کنترل زخم لیثمانیا و دریافت کننده گلوکانتیم کاهش یافته و در گروه تحت درمان با دارو گلوکانتیم ادم و التهاب شدید و نفوذ سلول‌های التهابی در درم و هیپودرم مشاهده شد (شکل C ۲-۷) و شواهدی از

کاهش التهاب و ادم در بافت پوست اطراف زخم گروه دارای زخم بدون درمان مشهود نبود. بافت غده لنفی در گروه‌های تحت درمان خوراکی با عصاره سیر و دارو گلوکانتیم به ساختار طبیعی نزدیک بود (شکل B ۲-۷).

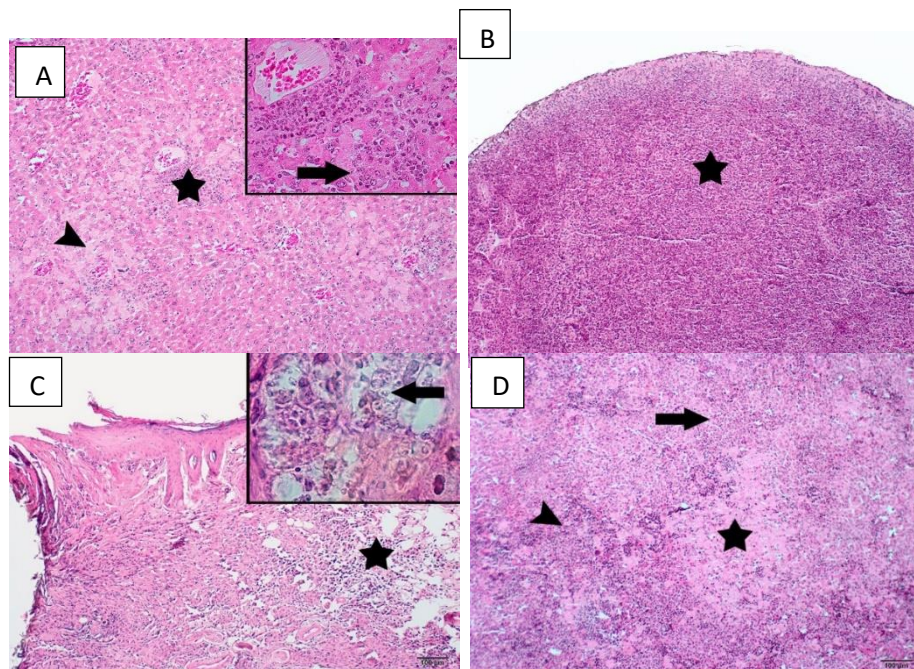
کاهش قابل توجه میزان آسیب و نکروز هپاتوسیت‌ها و کاهش فراوانی گرانولوم در کبد گروه با دریافت عصاره سیر قبل از بروز زخم دیده شد و نفوذ گسترده سلول‌های التهابی در نواحی مختلف به ویژه اطراف ورید مرکزی به همراه تشکیل گرانولوم در بافت کبد گروه ۲، ۵ و ۶ مشاهده گردید (شکل A ۲-۷). بافت طحال به عنوان یکی از ارگان‌های هدف انگل لیثمانیا در مدل تجربی دارای ساختار میکروسکوپی طبیعی همراه با بازسازی پالپ‌های سفید و قرمز در گروه ۳ مشهود بود، ولی شواهدی از تخریب ساختار پولپ‌های طحال در سایر گروه‌ها دیده شد (شکل ۲-۷).



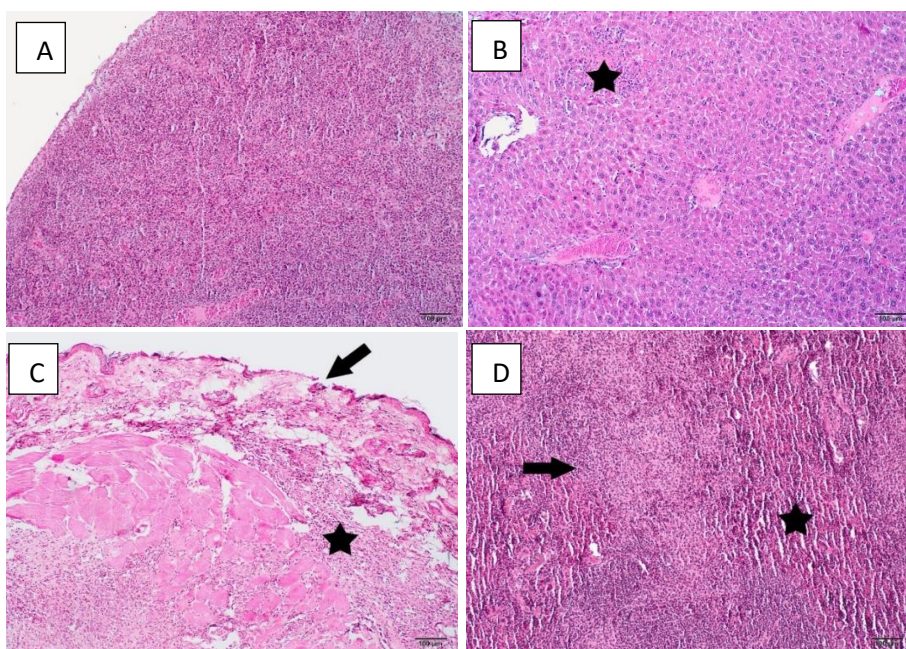
شکل ۱: اندازه زخم در گروه‌های مختلف کنترل و درمان در طول هفته‌های متفاوت



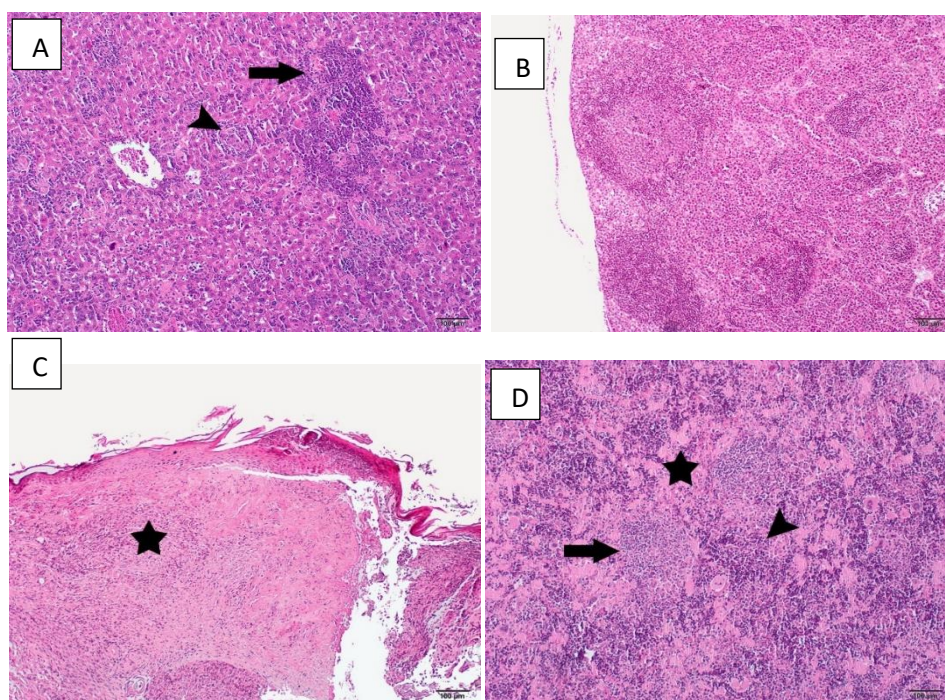
شکل ۲: گروه شاهد دریافت کننده عصاره سیر خوراکی A: کبد - ساختار میکروسکوپی ارگان طبیعی است. B: غده لنفاوی - ساختار میکروسکوپی ارگان طبیعی است. C: پوست - ساختار میکروسکوپی ارگان طبیعی است. D: طحال - ساختار میکروسکوپی ارگان طبیعی است.



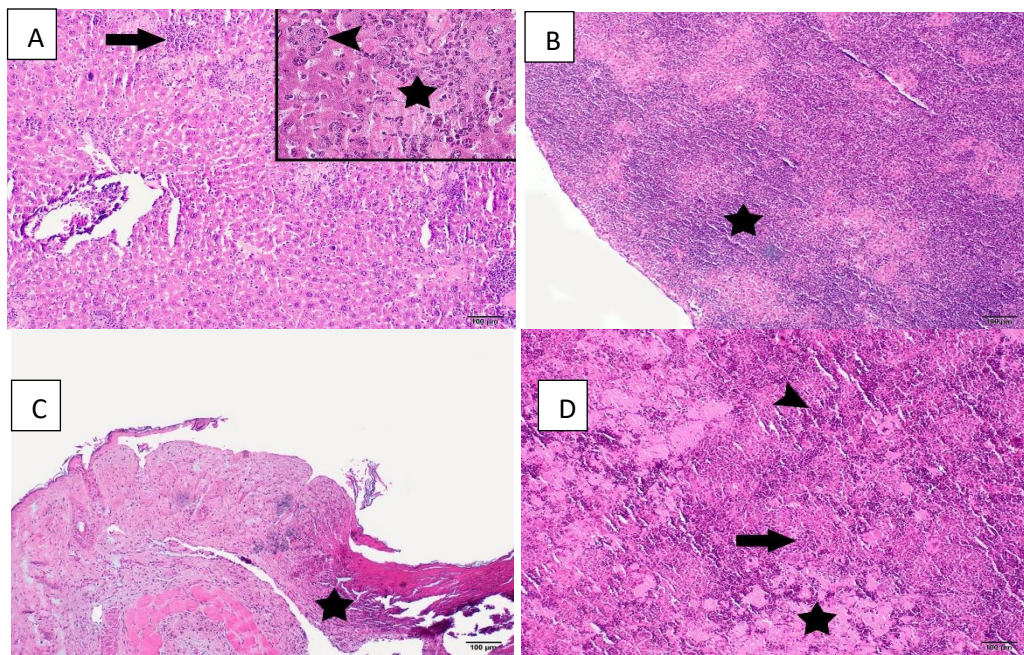
شکل ۳: کنترل زخم لیشمانیا مائور A: کبد - تورم ابری و نکروز شدید هیاتوسیت‌ها (نوک پیکان) به همراه التهاب و نفوذ گسترده سلول‌های التهابی در نواحی مختلف به ویژه اطراف ورید مرکزی (ستاره) و تشکیل گرانولوم‌ها و میکروگرانولوم‌های متعدد (پیکان) در سراسر پارانشیم ارگان B: غده لنفی - التهاب ناحیه قشر ارگان به همراه افزایش اندازه فولیکول‌های لنفاوی (ستاره) ناشی از افزایش جمعیت لنفوسیت‌ها C: پوست - وجود زخم پوست به همراه ادم و التهاب شدید و نفوذ سلول‌های التهابی در درم و هیپودرم (ستاره) و حضور آماستیگوت‌های انگل (پیکان) در ماکروفاژها (inset) D: طحال - نواحی پراکنده نکروز سلولی (ستاره) و تخریب ساختار بافتی پالپ‌های سفید (پیکان) و قرمز (نوک پیکان)



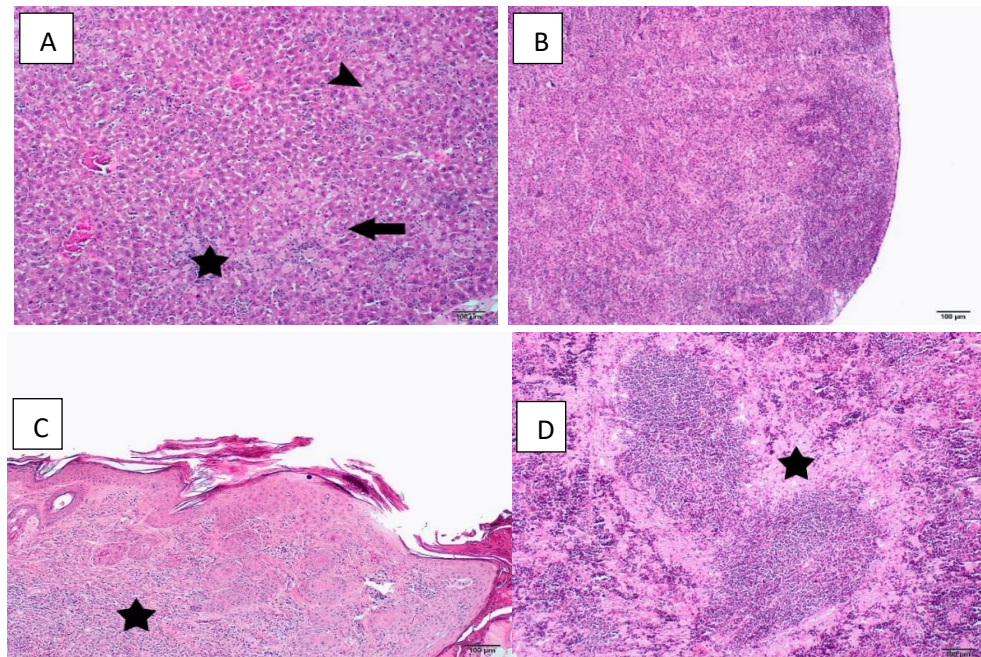
شکل ۴: دریافت *لیشمانیا ماژور* + عصاره خوراکی سیر قبل از ایجاد زخم A: کبد - کاهش قابل توجه میزان آسیب بافتی و نکروز هپاتوسیت‌ها و کاهش فراوانی گرانولوم‌ها (ستاره) در پارانشیم ارگان B: غده لنفی - بازگشت ساختار میکروسکوپی ارگان به حالت طبیعی C: پوست - کاهش اندازه زخم (پیکان) و شدت ادم و التهاب درم و هیپودرم (ستاره) D: طحال - تغییر برای ترمیم بافتی و بازگشت ساختار میکروسکوپی ارگان به سمت وضعیت طبیعی همراه با بازسازی پالپ‌های سفید (پیکان) و قرمز (ستاره)



شکل ۵: دریافت *لیشمانیا ماژور* + عصاره خوراکی سیر بعد از ایجاد زخم A: کبد - التهاب و نفوذ گسترده سلول‌های التهابی (پیکان) و تشکیل گرانولوم‌ها و میکروگرانولوم‌های متعدد (نوک پیکان) در سراسر ارگان B: عقده لنفی - وضعیت تقریباً طبیعی ساختار میکروسکوپی ارگان C: پوست - کاهش شدت ادم و التهاب درم و هیپودرم (ستاره) D: طحال - نواحی پراکنده نکروز سلولی (ستاره) و تخریب ساختار بافتی پالپ‌های سفید (پیکان) و قرمز (نوک پیکان)



شکل ۶: دریافت *لیشمانیا ماژور* + دریافت کننده پماد سیر A: کبد - تورم ابری و نکروز شدید هیپاتوسیت‌ها (ستاره) به همراه التهاب بافتی و نفوذ گسترده سلول‌های التهابی (پیکان) و تشکیل گرانولوم‌ها و میکروگرانولوم‌های متعدد (نوک پیکان) در سراسر پارانشیم ارگان B: غده لنفی - افزایش اندازه فولیکول‌های قشر ارگان (ستاره) C: پوست - وجود زخم وسیع پوست به همراه ادم و التهاب شدید و نفوذ سلول‌های التهابی در درم و هیپودرم (ستاره) D: طحال - نواحی پراکنده نکروز سلولی (ستاره) و تخریب ساختار بافتی پالپ‌های سفید (پیکان) و قرمز (نوک پیکان)



شکل ۷: دریافت *لیشمانیا ماژور* + دریافت داروی گلوکانتیم (تزریق عضلانی) A: کبد - تورم ابری و نکروز گسترده هیپاتوسیت‌ها (نوک پیکان) به همراه التهاب و نفوذ گسترده سلول‌های التهابی (ستاره) و تشکیل گرانولوم‌ها و میکروگرانولوم‌های متعدد (پیکان) B: غده لنفی - بازگشت نسبی ساختار میکروسکوپی ارگان به حالت طبیعی C: پوست - ادم و التهاب شدید و نفوذ سلول‌های التهابی در درم و هیپودرم (ستاره) D: طحال - نواحی پراکنده نکروز سلولی (ستاره) در ارگان

بحث

زخم ناشی از لیشمانیوز در اکثر موارد مقاوم به درمان بوده و روش‌های درمانی شیمیایی باعث ایجاد عوارض نامطلوب از جمله؛ مشکلات قلبی، عوارض کبدی، لکوپنی و پانکراتیت در بیماران با مصرف طولانی مدت دارو می‌گردد (۱۶، ۱۵)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از *لیشمانیا ماژور* در موش BALB/c تیمار شده با عصاره آبی سیر به عنوان یک ترکیب گیاهی جهت ارزیابی ترمیم زخم بود.

لیشمانیوز جلدی به عنوان یکی از معضلات بهداشتی در دسته بیماری‌های گرمسیری قرار دارد، سالانه حدود ۱۰ درصد از جمعیت جهان در ریسک ابتلا به این بیماری هستند. بعد از مالاریا، بالاترین میزان آسیب را در بین عفونت‌های انگلی داشته و تلاش‌های متعددی جهت پیشگیری و درمان قطعی و بدون عوارض این بیماری صورت گرفته است. خط اول درمان در این بیماری استفاده از ترکیبات آنتی‌موان و آمفوتریسین B بوده، ولی وجود اثرات توکسیک این داروها، بروز عوارض جانبی، مقاومت‌های دارویی و امتناع بیمار از مصرف مداوم دارو منجر به بررسی سایر روش‌های ایمن، با اثر طولانی و در دسترس شده است (۱۷). یک مطالعه مروری درمان‌های سنتی ایرانی (۱۸) و روش‌های مختلف تجویز را کاملاً شرح داده و بر اهمیت ترکیبات گیاهی از جمله عسل (۱۹) و صمغ کندر (۲۰) برای درمان لیشمانیوز جلدی اشاره داشته است. اخیراً

استفاده از ترکیبات گیاهی به دلیل داشتن اثرات درمانی شاخص، عوارض جانبی کمتر، دارا بودن ساختار ارگانیک و سازگار با طبیعت انسان، مقبولیت در میان مردم عام، تکنولوژی تولید ارزان و در دسترس مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۲۱). سیر دارای خواص تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، ضد عوامل میکروبی از جمله ویروس، تک یاخته، کرم، باکتری بوده و از سالیان گذشته تا کنون به عنوان یک ترکیب خانگی برای بهبود سرماخوردگی، کاهش فشار خون و برونشیت مصرف می‌گردد؛ محققان نیز در بررسی‌های متعددی ویژگی‌های دارویی این ترکیب را از ابعاد مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند (۲۲). اثرات درمانی سیر بر لیشمانیوز جلدی در محیط برون‌تنی و درون‌تنی مورد بررسی قرار گرفته و اثرات مختلفی از این ترکیب را به صورت پماد گزارش نمودند، از جمله این موارد به وسیله خوش‌زبان و همکاران با عنوان مقایسه اثر درمانی عصاره آبی و فرآورده‌های R10 سیر در درمان زخم ناشی از لیشمانیا در مدل‌های موشی بالغ سی و سی ۵۷ گزارش شده است که پماد R10 تهیه شده از عصاره سیر در بهبود زخم موش‌های مبتلا به لیشمانیوز جلدی ناشی از *لیشمانیا ماژور* از هفته سوم تیمار دارای تأثیر معنی‌دار بوده است (۲۳). استفاده از ترکیب عصاره سیر و ویتامین A در تیمار ۴۵ روز نیز اثرات مطلوبی را در روند بهبود زخم ناشی از *لیشمانیا ماژور* نشان داده است به نحوی که موجب تولید ترکیبات فعال نیتریک اکساید از

این اثر نیز پیرو فعال شدن ماکروفاژها به دنبال تولید سایتوکاین‌های ناشی از لنفوسیت‌های Th1 قابل توجه است، به طوری که ترمیم زخم در مدت زمان کوتاه‌تر و کاهش التهابات در ارزیابی هیستوپاتولوژیک، نمود فعالیت این نوع پاسخ به همراه سایتوکاین‌های ضدالتهابی در موش بالب سی حساس به لیشمانیا مژور می‌باشد (۲۷) که علاوه بر بافت پوست اطراف زخم، ساختار ارگان‌های درگیر در عفونت لیشمانیا مژور از جمله طحال، غده لنفی و کبد نیز متأثر از مصرف خوراکی عصاره سیر در گروه‌های تحت درمان قرار گرفت. غده لنفی به عنوان یکی از ارگان‌های مهم پاسخ‌های ایمونولوژیک در زمان عفونت ناشی از لیشمانیا مطرح بوده و در این بررسی تحت تأثیر تیمار با عصاره سیر قرار گرفت، تشکیل مراکز زایا و افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها در ابتدا دوره درمان در ساختار غده لنفی موش‌های تحت درمان با عصاره سیر به صورت خوراکی مشهود بود و با گزارش‌های مبتنی بر تأثیر عصاره سیر بر هایپرتروفی و هایپرپلازی ناحیه پاراکوتکس غده لنفی و (PALS) طحال به عنوان محل قرارگیری لنفوسیت‌های T و فعال نمودن فولیکول‌های لنفاوی مطابقت دارد که این فعالیت با تأثیر ترکیبات سیر بر ازدیاد حساسیت تأخیری با شرکت فعال لنفوسیت‌های Th و افزایش عملکرد ایمنی سلولی به عنوان یک رکن مهم در محدود نمودن عفونت لیشمانیا ادامه می‌یابد (۲۸). کورتکس غده لنفی و پارانشیم طحال در گروه‌های بدون درمان و یا دریافت کننده دارو

ماکروفاژهای آلوده و در نهایت کنترل عفونت شده است (۲۴).

استفاده خوراکی عصاره آبی سیر در بررسی حاضر، اثرات مطلوب ترمیم را در گروه‌های تحت درمان نشان داد و این اثر در گروه دریافت کننده عصاره سیر به صورت خوراکی و قبل از دریافت انگل، روند بهبود معنی‌داری را از لحاظ کاهش قطر زخم و ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک را نشان داد، این تأثیر می‌تواند ناشی از اثرات تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی پیرو وجود ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدانهای مختلف در سیر باشد، اثرات تنظیمی سیستم ایمنی سیر شامل تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و افزایش پاسخ محور Th1، افزایش فعالیت فاگوسیتوز ماکروفاژها در لیشمانیوز گزارش گردیده و ابعاد مختلف پاسخ‌های ایمنی با تمرکز بر سایتوکاین‌های التهابی از جمله IL-12 و IFN- γ به عنوان عوامل کلیدی در کنترل عفونت ناشی از لیشمانیوز جلدی ارزیابی شده است که در این بین، غضنفری و همکاران، تغییر پاسخ‌های ایمنی به سمت فعالیت Th1 و تولید سایتوکاین‌ها را به دنبال استفاده از عصاره سیر در موش‌های بالب سی را گزارش دادند (۲۵)، همچنین پژوهش‌ها نشان داده است که در مدل درون‌تنی، عصاره سیر موجب تحریک پاسخ‌های Th1 شده و منجر به فعالیت ماکروفاژها در مقابل لیشمانیا مژور می‌گردد (۲۶). نتایج حاصل از این مطالعه، کاهش قطر زخم و شدت التهاب در اپیدرم و درم موش‌های تحت درمان با عصاره خوراکی سیر را به خوبی نشان داد،

گلوکانتیم، دارای ساختار نامتقارن و با حدود نامنظم تکثیر لنفوسیتی و فولیکول‌های لنفاوی همراه بود، تغییرات بافتی پوست اطراف زخم در گروه تیمار شده با پماد سیر به صورت موضعی برخلاف گروه دریافت کننده سیر به صورت خوراکی شواهدی از کاهش التهاب و ترمیم را نشان نداد و قطر زخم در این گروه نیز کاهش معنی‌دار را نسبت به گروه‌های دریافت کننده عصاره خوراکی سیر و دارو گلوکانتیم بروز نداد، سایر ارگان‌ها از جمله غدد لنفی و طحال نیز متأثر از دریافت پماد موضعی سیر قرار نگرفتند و از نظر هیستولوژیک مشابه گروه‌های بدون درمان و یا دریافت کننده دارو گلوکانتیم بود که این تأثیرات ناشی از اثرات سیستمیک ناشی از عفونت با لیشمانیا ماژور در موش بالب سی می‌باشد (۲۷). فعالیت پاسخ‌های ناشی از لنفوسیت‌های Th1 در مقابل با عفونت لیشمانیا در جهت بهبود روند ترمیم زخم و حذف انگل با مکانیسم افزایش قدرت فاگوسیتوز در ماکروفاژهای آلوده تحت تأثیر سایتوکاین‌های تولید شده به وسیله این لنفوسیت‌ها کلید اصلی کنترل و بهبود بیماری در لیشمانیوز جلدی می‌باشد، ترکیبات موجود در سیر با اثرات ایمونومدولاتوری مبتنی بر تولید سایتوکاین‌ها، موجب تغییر پاسخ از لنفوسیت‌های Th2 به سمت Th1 شده و همین تأثیر می‌تواند روند بهبود زخم را در پژوهش‌های متعدد و پیرو مصرف عصاره سیر توجیه نماید (۲۹)، اگرچه در برخی از منابع نیز از اثرات کاهش پاسخ‌های پیش التهابی به دنبال استفاده عصاره سیر در لنفوسیت‌های

خون محیطی بیماران مبتلا به التهاب روده و در شرایط برون‌تنی نیز اشاره شده است (۳۰) که البته با توجه به ارتباطات پاراکرین پروتئین‌های ترشحی فعال در پاسخ ایمنی، نحوه پاسخ‌های ایمنی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی می‌تواند متفاوت بوده و نتایج منطبق بر یکدیگر نباشد. طبق اعلام سازمان جهانی بهداشت مبنی بر معرفی روش‌های درمانی طبیعی بر علیه لیشمانیوزیس (۳۱) تحقیقات قابل توجهی در این زمینه صورت گرفته و در حال انجام است، عصاره سیر نیز به دلیل دارا بودن مواد مؤثره بسیار متنوع با خصوصیات ضدلیشمانیایی از جمله آلیسین (Allicin) (۳۲) بسیار مورد توجه بوده و بررسی‌های گسترده‌ای در ارتباط با بررسی ابعاد مختلف اثرات ترکیبات سیر توصیه می‌گردد.

از محدودیت‌های انجام پژوهش حاضر می‌توان به عدم آزمایشات برون‌تنی برای تعیین دوز مؤثر عصاره سیر و استفاده از حداقل غلظت مهارتی اشاره کرد، که به همین منظور بر استفاده از غلظت‌های پیشنهادی در مقالات معتبر استناد شد، لذا پیشنهاد می‌شود که تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیر بر روی پروماستیگوت‌های انگل در محیط برون‌تنی انجام و دوز مؤثر بر انگل در شرایط درون‌تنی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

استفاده از عصاره سیر به عنوان یک ترکیب گیاهی و دارای مواد مؤثره فعال بر علیه انگل لیشمانیا

مشارکت نویسندگان

طراحی اصلی و تفسیر نتایج پژوهش به وسیله دکتر حسین رضوان، آزمایشات برون تنی به وسیله مریم ربیع مقدم، بررسی پاتولوژیک به وسیله دکتر علیرضا نوریان و جمع بندی نتایج و تدوین و نگارش پژوهش به وسیله دکتر سحر هامون نورد صورت گرفته است.

می تواند حایز اهمیت بوده و طبق نتایج حاصل از مطالعه حاضر از جنبه تغییرات هیستوپاتولوژیک با تمرکز بر فرآیندهای التهابی ارگان های مرتبط با عفونت ناشی از *لیشمانیا ماژور* در موش بالب سی، مصرف خوراکی این ماده با اثرات ایمونومدولاتوری سیستم می تواند در روند ترمیم زخم لیشمانیوز جلدی مؤثر باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی و مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی کمال تقدیر و تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان بیان نمودند که هیچ موردی از تعارض منافع در پژوهش حاضر وجود ندارد.

حمایت مالی

تأمین مالی این پژوهش به وسیله دانشگاه بوعلی سینا صورت گرفته است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی از دانشگاه بوعلی سینا با کد اخلاق IR.BASU.REC.1398.053 می باشد.

REFERENCES

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2010; (949): xii-xiii, 1-186, back cover. PMID: 21485694.
2. Mohammad Hossien Feiz Haddad AG, Mehry Sharify Nia. Epidemiological study of leishmaniasis in Iran and the middle East in the last two decades. Jundishapur Scientific Medical Journal 2021;20(2):86-101.
3. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. Clinical microbiology reviews 2005;18(2): 293-305.
4. Hejazi SH, Nabipour R. Topical Fluconazole Combined with Local Glucantime Injection Compared with Local Glucantime Injections in Treatment of Leishmaniasis. Journal of Isfahan Medical School 2011; 28(118): 1281-1289.
5. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Medicine and Infectious Disease 2007; 5(3): 150-8.
6. Zakraoui H, Zaatour A, Ftaiti A, Zaafouri B, Garraoui A, Olliaro P, et al. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1995; 53(2): 162-6.
7. Khajedaluae M, Yazdanpanah MJ, SeyedNozadi S, Fata A, Juya MR, Masoudi MH, et al. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in population covered by Mashhad University of Medical Sciences in 2011. Medical Journal of Mashhad university of Medical sciences 2014; 57(4): 647-54.
8. Gül E, Nurullazade Y, Kaya E. Larva treatment from past to present in chronic wounds. International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research 2020; 1(3): 154-61.
9. Tajbakhsh E, Khamesipour A, Hosseini SR, Kosari N, Shantiae S, Khamesipour F. The effects of medicinal herbs and marine natural products on wound healing of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. Microbial Pathogenesis 2021;161(Pt A): 105235.
10. AyatollahiMousavi S, Mehrabian M, Yaghmai B. The Effect of different concentrations of methanol and aqueous extracts of garlic on opportunistic fungi sporothrix schenckii, *cryptococcus neoformans* and *candida albicans*. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 2008; 7(4): 227-34.
11. Chowdhury A, Ahsan M, Islam S, Ahmed ZU. Efficacy of aqueous extract of garlic & allicin in experimental shigellosis in rabbits. The Indian Journal of Medical Research 1991; 93: 33-36.
12. Gharavi MN, Nobakht M, Khademvatan Sh, Bandani E, Roozbehani M, Bakhshayesh M, Samadi Koochaksaraei A. The effect of garlic extract on expression of ifn- γ and inos genes in macrophages infected with leishmania major. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 2012; 11(4): 313-22.
13. Ali Bagherin HA, Sakineh Saeidisar, Motahareh Mirzaei, Hamid Reza Mirzaei, Hamed Mirzaei. The effect of garlic extract on *Leishmania major* Amastigotes: *in vitro* and *in vivo* studies. Research in Medicine 2015; 38(4) :181-6.
14. Hassan ZM, Yaraee R, Zare N, Ghazanfari T, Nejad AHS, Nazori B. Immunomodulatory affect of R10 fraction of garlic extract on natural killer activity. International immunopharmacology 2003;3(10-11):1483-9.
15. Soto J, Valda-Rodriquez L, Toledo J, Vera-Navarro L, Luz M, Monasterios-Torrico H, et al. Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2004; 71(5): 577-81.
16. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Tropica 2011; 118(2): 87-96.
17. Mcgwire BS, Satoskar A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM: An International Journal of Medicine 2014; 107(1): 7-14.
18. Parvizi MM, Zare F, Handjani F, Nimrouzi M, Zarshenas MM. Overview of herbal and traditional remedies in the treatment of cutaneous leishmaniasis based on Traditional Persian Medicine. Dermatologic Therapy 2020; 33(4): e13566.
19. Nilforoushzadeh MA, Jaffary F, Moradi S, Derakhshan R, Haftbaradaran E. Effect of topical honey application along with intralesional injection of glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis .BMC Complementary and Alternative Medicine 2007; 7(13): 1-4.

20. Ali SI, Zhang CR, Mohamed AA, El-Baz FK, Hegazy AK, Kord MA, et al. Major constituents of *Boswellia carteri* resin exhibit cyclooxygenase enzyme inhibition and antiproliferative activity. *Natural Product Communications* 2013; 8(10): 1934578X1300801005.
21. Gurei M, Tatli N, Ozbilge H, Erel O, Seyrek A, Kocyigit A, et al. Efficacy of cryotherapy and intralesional pentostam in treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 2000;30(1):169-76.
22. Newall CAL, Philipson JD. *Herbal medicine-guide for health-care professionals*. 1th ed. The Pharmaceutical Press (UK): London; 1996;129-33.
23. Khoshzaban F, Mahmoudzadeh Pournaki A, Ghazanfari T, Naseri M, Khamesipour A, Naeini A. Comparison of the therapeutic effect of aqueous extract and R10 products of garlic in the treatment of wounds caused by *Leishmania major* in Balb/C, C57BL/6 and souris models. *Pathobiology Research* 1390;14(3): 25-34.
24. Ahmadi-Renani K, Mahmoodzadeh A, Cheraghali A, Esfahani A. Effect of garlic extract on cutaneous leishmaniasis and the role of nitric oxide. *Iranian Journal of Medical Sciences* 2015; 27(3): 97-100.
25. Ghazanfari T, Hassan Z, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-infected Balb/c mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 2000; 52(5): 491-5.
26. Ghazanfari T, Hassan ZM, Khamesipour A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 103(3): 333-7.
27. Akhbari S, Rezvan H, Zolhavarieh SM, Moafi M. Comparison of proinflammatory gene expression in lesions caused by either burn injuries or cutaneous Leishmaniasis. *Gene Cell and Tissue* 2017; 4(1): e13324.
28. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebrahimi M. Immunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. *International Immunopharmacology* 2002; 2(11): 1541-9.
29. Gamboa-León M, Aranda-González I, Mut-Martín M, García-Miss M, Dumonteil E. *In vivo* and *in vitro* control of *Leishmania mexicana* due to garlic-induced NO production. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007; 66(5): 508-14.
30. Hodge G, Hodge S, Han P. *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production *in vitro*: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry. The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 2002; 48(4): 209-15.
31. World Health Organization. *Traditional and Modern Medicine: Harmonizing the Two Approaches: a Report of the Consultation Meeting on Traditional and Modern Medicine: Harmonizing the Two Approaches, 22-26 November 1999, Beijing, China, 11-17.*
32. Corral-Caridad MJ, Moreno I, Toraño A, Domínguez M, Alunda JM. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Experimental Parasitology* 2012; 132(4): 475-82.

Investigation of Histopathological Changes Caused by *Leishmania major* in BALB/c Mice Treated with Aqueous Extract of *Allium sativum*(Garlic)

Rabia Moghadam M, Rezvan H*, Nourian A, Hamoonnavard S

Department of Pathobiology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: 17 Aug 2024 Accepted: 03 Nov 2024

Abstract

Background & aim: Cutaneous leishmaniasis is a tropical and treatment-resistant disease which the range of treatment strategies based on effective plant substances has been expanded due to the side effects of standard drugs. Therefore, the aim of the present study was to determine and investigate the histopathological changes caused by *Leishmania major* in BALB/c mice treated with aqueous extract of garlic.

Methods In this experimental study, which was conducted in 2018 at the Faculty of Veterinary Medicine of Bou Ali Sina University,, 36 female BALB/c mice with an average weight of 30g were equally divided into 6 groups and the standard strain of *Leishmania major* parasite was injected into 5 groups. Three groups were treated with aqueous garlic extract orally and topically, and three groups were treated as control, without treatment and received Glucantim as drug. The size of the wound in five groups were evaluated weekly, and after the 90-day of treatment, skin tissue around the wound, lymph nodes, spleen, and liver were taken for histopathologic evaluation. The collected data were analyzed using statistical tests of two-way analysis of variance ($pvalue \leq 0.05$).

Results: A significant reduction in wound size was observed in the groups receiving the garlic extract orally ($p \leq 0.0001$). The structures of the lymphoid organs differed in these two groups in inflammation, granuloma, and lymphocyte populations compared to the control groups and even to the group receiving garlic topical ointment, and the healing process was observed in them, also, wound healing was significantly accelerated in the group receiving oral garlic extract before parasite injection ($p \leq 0.05$). Histopathological changes in the group receiving garlic ointment also showed evidence of wound healing, but at the end of the treatment period, it was less effective than the group receiving oral garlic ($p \leq 0.05$).

Conclusion: The oral extract of garlic changes the inflammatory reactions in the wound site of cutaneous leishmaniasis towards repair and accelerates the healing process of the wound. Garlic extract compounds can be considered as a natural treatment option in treatment-resistant *Leishmania* infection.

Keywords: Aqueous extract of garlic, Cutaneous leishmaniasis, Histopathology, BALB/c mice

*Corresponding author: Rezvan H, Department of Pathobiology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Email: h.rezvan@basu.ac.ir

Please cite this article as follows: Rabia Moghadam M, Rezvan H, Nourian A, Hamoonnavard S. Investigation of Histopathological Changes Caused by *Leishmania major* in BALB/c Mice Treated with Aqueous Extract of *Allium sativum*(Garlic). Armaghane-danesh 2024; 29(5): 642-656.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal