بنام خداوند جان و خرد

دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه پژوهشی برای دریافت درجه

دکترای حرفه ای در رشته پزشکی

عنوان :

بررسی مسیر آپوپتوزی عصاره سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

استاد راهنما اول:

دکتر بهنام محمدی قلعه بین

استاد راهنما دوم:

دکتر علی نیاپور

استاد مشاور:

دکتر شهاب بهلولی

نگارش:

احسان افسر

تابستان سال ۹۸

شماره پایان نامه : ۰۷۳۹

با سپاس از :

پدر و مادر بزرگوارم که سوختند و ساختند تا روشنای بیغوله راه‌های زندگی ام گردند تا من ناچیز کورکورانه در این راه قدم برندارم ...

برادر عزیزتر از جانم که همواره با بودنش، قوت قلبی در انتخاب دو راهی‌های زندگی ام بوده و هست...

همسر نازنینم که با عاشقانه‌های بی پایانش آرامش سخت ترین روزهای زندگی ام را فراهم کرد و با قلب لبریز از مهربانی اش حسرت تمام نا کرده‌های دنیا را برایم بی مفهوم ساخت ...

اساتید مهربانم که گرمابخش وجودم بودند ...

و تقدیم به روح

استاد نادیده ام ؛ که با زیستن در آثارش، زندگی رابه

شرط تفکر و نفس کشیدن را به طعم عشق آموختم

...

عالی جناب "عباس کیارستمی"

بررسی مسیر آپوپتوزی عصاره سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیوز گروهی از بیماری‌های عفونی است که توسط گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و تظاهرات بالینی آن به فرم‌های مختلف دیده می‌شود. مقاومت انگل نسبت به داروهای خط اول و دوم درمان در نقاط مختلف جهان در حال افزایش می‌باشد. با توجه به اثر ضد لیشمانیایی عصاره سیاه تخمه این مطالعه با هدف بررسی اثر القایی آپوپتوز عصاره سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با استفاده از اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ و میزان فسفاتیدیل سرین انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه عصاره سیاه تخمه، پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در محیط کشت BHI با غلظت IC50 (۰/٤ میلی گرم در میلی لیتر) عصاره سیاه تخمه تیمار شدند. فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ و همچنین رنگ آمیزی توسط کیت انکسین پی‌ای (Annexin V/PI) به ترتیب به روش اندازه گیری نشر نور لومینیسانس و فلوسایتومتری بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ در گروه تیمار با غلظت ۰/٤ میلی گرم در میلی لیتر عصاره سیاه تخمه، در مقایسه با گروه کنترل که شامل صرفا پروماستیگوت‌های لیشمانیای ماژور به تعداد ۱×۱۰^{۷}سلول بود به صورت معناداری ($P<0.001$)افزایش داشت. همچنین تیمار پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با غلظت IC50 عصاره *Agrostemma githago* و بررسی القای مسیر آپوپتوزی در این سلول‌ها توسط کیت Annexin V/PI پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت از تیمار نشان داد جمعیت سلول‌های آپوپتوز اولیه و ثانویه در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری ($P<0.001$) افزایش داشت، همچنین افزایش مدت زمان تیمار تا ٤٨ ساعت سبب شد تا از درصد سلولها در زیر گروه آپوپتوز اولیه کاسته و به زیرگروه آپوپتوز ثانویه افزوده شود.

نتیجه گیری:

افزایش فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ و همچنین میزان فسفاتیدیل سرین در لایه بیرونی غشای پروماستیگوت لیشمانیا نشان دهنده القا موثر فرایند آپوپتوز پیرو تیمار با عصاره *Agrostemma githago* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷، سیاه تخمه، فسفاتیدیل سرین، *لیشمانیا ماژور*

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: طرح تحقیق

۱-۱- مقدمه و بیان مسئله:..... ۱

۱-۲- روش اجرای طرح:..... ۱

۱-۳-تعریف واژه‌های کلیدی:..... ۳

۱-٤-۱- هدف کلی:..... ٤

۱-٤-۲-اهداف اختصاصی:..... ٤

۱-٤-۳- اهداف کاربردی:..... ٤

۱-۵- فرضیات یا سؤالات تحقیق:..... ٤

فصل دوم: پیشینه‌ی تحقیق

۲-۱-کلیات لیشمانیوز..... ۷

۲-۱-۱-تعریف لیشمانیوز..... ۷

۲-۱-۲- تاریخچه..... ۹

۲-۲- مورفولوژی:..... ۹

۲-۳- چرخه زندگی..... ۱۱

۲-٤ : اشکال مختلف بیماری لیشمانیوز..... ۱۲

۲-٤-۱: لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)..... ۱۲

۲-٤-۲- لیشمانیوز جلدی..... ۱۳

۲-۵- اشکال بالینی لیشمانیوز جلدی..... ۱٤

۲-۵-۱- لیشمانیوز جلدی شهری‌یا انسان دوست (ACL)..... ۱٤

۲-۵-۳- لیشمانیوز پوستی منتشر(DCL) ۱۵

۲-۵-۴- لیشمانیوز پوستی- مخاطی( ) MCL..... ۱٦

۲-۵-۵- لیشمانیوز مزمن راجعه(LR) ۱۷

۲-۶- ایمنی شناسی لیشمانیازیس..... ۱۷

۲-۷- انتقال و سرایت بیماری..... ۱۸

۲-۷-۱- روش اصلی انتقال..... ۱۸

۲-۷-۲- روش‌های فرعی انتقال..... ۱۹

۲-۸- درمان لیشمانیوز..... ۱۹

۲-۸-۱- درمان لیشمانیازیس احشایی ۲۰
۲-۸-۲- درمان لیشمانیازیس جلدی ۲۱
۲-۸-۳- سرما درمانی ۲۲
۲-۸-۴- گرمای کنترل شده لوکالیزه شده ۲۳
۲-۸-۵- CO2 Laser ۲۳
۲-۹- مقاومت‌یا عدم پاسخ به درمان ۲٤
۲-۱۰- اپیدمیولوژی و مطالعات ۲۵
۲-۱۰-۱- اپیدمیولوژی لیشمانیوز در جهان ۲۵
۲-۱۰-۲- مطالعات داروئی روی لیشمانیوز در جهان ۲۵
۲-۱۰-۳- اپیدمیولوژی لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران ۲۷
۲-۱۰-۴- مطالعات داروئی لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران ۲۸
۲-۱۰-۵- توصیف بیماری لیشمانیوز در استان اردبیل ۳۱
۲-۱۱- اثر آنتی لیشمانیایی برخی از گیاهان داروئی ۳۱
۲-۱۱-۱- Tanacetum parthenim ۳۱
۲-۱۱-۲- Allium cepa ۳۲
۲-۱۱-۳- Zhumeria majdae ۳۲
۲-۱۱-٤- *Aloe vera* ۳۳
۲-۱۱-۵- Peganum harmala ۳۳
۲-۱۱-۶- Sambucus ebulus ۳٤
۲-۱۱-۷- Agrostemma githago ۳٤
۲-۱۲ - آپوپتوز و مسیرهای آپوپتوزی ۳٦

فصل سوم: شیوه اجرای تحقیق

۳-۱- نوع پژوهش ۳۹
۳-۲- مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در تحقیق ۳۹
۳-۳-تجهیزات آزمایشگاهی ٤۰
۳-٤- وسایل و ظروف مورد استفاده ٤۰
۳-۵- روش تهیه مواد استفاده شده در تحقیق ٤۱
۳-۵-۱- محیط کشت BHI با حجم‌یک لیتر ٤۱
۳-۵-۲- محلول PBS(1X) با حجم‌یک لیتر ٤۱

۳-٦- روش کار..... ٤٢
۳-٦-۱- کشت انگل..... ٤٢
۳-٦-۲- استخراج عصاره آبی از گیاه سیاه تخمه..... ٤٢
۳-٦-۳- بررسی القای مسیرهای آپوپتوزی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و۷..... ٤٣
۳-٦-٤- بررسی القای مسیرهای آپوپتوزی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به روش Annexin V/PI ... ٤٣
۳-۷- ملاحظات اخلاقی..... ٤٤

فصل چهارم: نتایج

٤-۱- اثر عصاره سیاه تخمه (Agrostemma githago) در القای مسیرهای آپوپتوزی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳و۷ و فسفاتیدیل سرین در لایه بیرونی غشا سلولی ٤٦
٤-۱-۱- نتایج حاصل از بررسی اثر آپوپتوتیک عصاره دانه *Agrostemma githago* بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با استفاده از فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷..... ٤٦
٤-۱-۲- نتایج حاصل از بررسی اثر آپوپتوتیک عصاره دانه *Agrostemma githago* بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به روش Annexin V/PI..... ٤٧

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱- بحث..... ۵۰
۵-۲- نتیجه گیری:..... ۵٤
۵-۳- پیشنهادات:..... ۵۵
۵-٤- محدودیت‌های این مطالعه:..... ۵٦
منابع..... ۵۷

قهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار ۱ . میزان فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳ و ۷ در گروه کنترل که شامل صرفا پروماستیگوت های لیشمانیای ماژور به تعداد ۱×۱۰^{۷}سلول در مقایسه با همان تعداد سلول که با غلظت ۰/٤ میلی گرم در میلی لیتر عصاره سیاه تخمه تیمار شده نشان میدهد که میزان فعالیت آنزیم در گروه تیمار نزدیک به دو برابر گروه کنترل است. ٤٧

نمودار ۲ . Population histogram و فلوسایتومتری سلول‌های پروماستیگوت لیشمانیای ماژر. قسمت A، B و C به ترتیب روند تجمع سلول‌ها در زیر گروه‌های چهارگانه را در گروه‌های کنترل و تیمار شده با غلظت IC_{50} از عصاره *Agrostemma githago* به مدت ٢٤ و ٤٨ ساعت را نشان داده است. نتایج کمی هیستوگرام‌های پیشین به صورت نمودار ستونی در قسمت D آورده شده است. ٤٨

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۲-۱: مقایسه شکل پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیای ماژور ۹
شکل ۲-۲: آماستیگوت‌های لیشمانیا داخل سیتوپلاسم در اسمیر رنگ آمیزی شده با گیسما ۱۰
شکل۳-۲: پروماستگوت‌های لیشمانیا ۱۰
شکل ٤-۲: چرخه زندگی لیشمانیا ۱۲
شکل ٦-۲: لیشمانیوز جلدی روستاییا حیوان دوست ۱۵
شکل ۸-۲: لیشمانیوز پوستی- مخاطی ۱٦
شکل۱۰-۲ : پشه خاکی ۱۹