

Effect of aloe-emodin on growth and induction of apoptosis in *Leishmania major* promastigotes in vitro

Delavari M, Dalimi-Asl A*, Ghaffarifar F, Sadraei J

Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

Received March 2, 2012; Accepted September 9, 2013

Abstract:

Background: Cutaneous leishmaniasis is an endemic disease in some parts of Iran. The use of pentavalent antimony compounds as first therapeutic choice is associated with limitations and several adverse effects and complications. This study aimed to evaluate the effect of aloe-emodin on *Leishmania* major promastigote growth in vitro conditions and also the effect of aloe-emodin on induction of apoptosis in *Leishmania major* promastigotes.

Materials and Methods: In this experimental study, different concentrations (40, 80, 120 and 160 µg/ml) of aloe-emodin were tested in three different times (24, 48 and 72h) on *Leishmania* promastigotes and the IC₅₀ was calculated by counting the number of parasites. The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay was used to determine the percentage of live promastigotes after adding aloe-emodin. Apoptosis at three different concentrations (40, 80 and 120 µg/ml) was evaluated by flowcytometry and also the percentages of early and late apoptosis and necrosis were determined.

Results: Result showed that aloe-emodin has an inhibitory effect on the growth of *Leishmania* promastigotes. The IC₅₀ value was 52.79µg/ml. Moreover, the results of flowcytometry showed that aloe-emodin induced the early and late apoptosis in *Leishmania* promastigotes.

Conclusion: Aloe-emodin shows an antileishmanial effects in vitro condition and regarding its herbal origin, it can be tested as the new drug in vivo studies.

Keywords: *Leishmania major*, Aloe-emodin, flow cytometry, Apoptosis, MTT

* Corresponding Author.

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Tel: 0098 21828 83838

Fax: 0098 21828 84555

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences November, 2013; Vol. 17, No 5, Pages 422-428

Please cite this article as: Delavari M, Dalimi-Asl A, Ghaffarifar F, Sadraei J. Effect of aloe-emodin on growth and induction of apoptosis in *Leishmania major* promastigotes in vitro. *Feyz* 2013; 17(5): 422-8.

تأثیر آلوئه امودین بر رشد و القای آپوپتوز در پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور در شرایط آزمایشگاهی

۱ مهدی دلاوری ، عبدالحسین دلیمی^{*} ، فاطمه غفاری فر ، جاوید صدرایی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: لیشمانیازیس جلدی یکی از بیماری‌های انديك در برخی از مناطق ایران است. استفاده از ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی به عنوان داروهای خط اول درمان، با محدودیت‌ها و عوارض جانبی متعددی همراه می‌باشد. از این‌رو، همواره تلاش برای یافتن روش‌های درمانی جدید و مؤثر مورد نظر است. در پژوهش حاضر تأثیر آلوئه امودین بر رشد پروماستیگوت لیشمانیا مژور در شرایط برون‌تنی مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین تأثیر آلوئه امودین در روند القای آپوپتوز در پروماستیگوت‌های انگل سنجیده شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی غلظت‌های مختلف (۴۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از آلوئه امودین در سه زمان (۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت) بر پروماستیگوت‌های انگل تأثیر داده شده و با استفاده از شمارش تعداد انگل MTT تعیین شد. هم‌چنین برای تعیین درصد پروماستیگوت‌های زنده پس از افزودن آلوئه امودین از روش MTT استفاده شد. در ادامه با استفاده از آزمون فلوسايتومتری میزان آپوپتوز در سه غلظت (۴۰، ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بررسی شده و درصد آپوپتوز اولیه، تاخیری و نکروز مشخص شد.

نتایج: آلوئه امودین اثر ممانعت‌کننده‌ی بر رشد پروماستیگوت‌های انگل است و میزان IC50 ۵۲/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. هم‌چنین، نتایج حاصل از آزمون فلوسايتومتری نشان داد که آلوئه امودین باعث القای آپوپتوز اولیه و تاخیری در پروماستیگوت لیشمانیا مژور می‌شود.

نتیجه‌گیری: آلوئه امودین دارای اثرات ضد لیشمانیایی بوده و با توجه به اینکه ماده‌ای با منشأ گیاهی است، می‌تواند به عنوان دارویی جدید در بررسی‌های درون‌تنی مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لیشمانیا مژور، آلوئه امودین، فلوسايتومتری، آپوپتوز، MTT

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۲، صفحات ۴۲۸-۴۲۲

زخم سالک چندان مشکل آفرین نبوده و اغلب ضایعات آن خود به‌خود بهبود می‌یابند، ولی به دلائل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم، بد شکل بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه ارائه روش درمانی آسان، قابل تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد [۷، ۶]. مطالعه بر روی گیاهان دارویی جهت یافتن دارویی مناسب علیه انگل لیشمانیا و بیماری لیشمانیازیس از اهمیت بالایی برخوردار است [۸]. آلوئه امودین یکی از ترکیبات اصلی و موثر گیاه آلوئه‌ورا می‌باشد که در عصاره برگ این گیاه وجود دارد و دارای اثر ضد سرطانی است. آلوئه‌ورا نام گیاهی است از سرده سیگل‌ها (Aloe)، راسته مارچوبه‌ای‌ها (Asparagales) و تیره سریشیان (Asphodelaceae) که بومی آفریقای شمالی است. آلوئه‌ورا واحد ویژگی‌های مهم درمانی از جمله تقویت و تعدیل سیستم ایمنی در بیماری‌های التهابی و ویروسی (مثل تبخال)، ترمیم زخم، ترمیم آسیب‌های ناشی از سوختگی و اثرات ضد التهابی است [۹، ۱۰]. نخستین بار مصری‌ها این گیاه را برای درمان زخمهای سوختگی و عفونت به کار گرفتند. از دهه ۱۹۳۰ به بعد تحقیقات علمی وسیعی بر روی ترکیبات و خواص دارویی این گیاه انجام شد و دریافتند عصاره صاف شده این گیاه تأثیر زیادی در درمان زخمهای سوختگی‌ها

مقدمه

عامل لیشمانیازیس تک یاخته انگلی از خانواده تریپانوزو-ماتیده، بنام لیشمانیا است. این بیماری در پنج قاره و ۸۱ کشور جهان به صورت انديك وجود دارد. سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون مورد جدید از بیماری در جهان گزارش می‌شود. لیشمانیازیس به سه شکل بالینی جلدی، جلدی مخاطی و احتشامی وجود دارد [۲، ۱]. در فرم جلدی علامت بالینی به شکل زخمی است که از چند هفته تا چند ماه پس از آلوئه شدن شخص سر باز می‌کند [۳]. برای درمان از ترکیبات آنتیموان استفاده می‌شود، ولی این ترکیبات دارای عوارض هستند و مقاومت دارویی و نیز عود بیماری پس از درمان وجود دارد [۵، ۴].

^۱ دانشجوی دکترای تخصصی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

***نشان نویسنده مسئول:**

تهران، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۵۵

دورزنیس: ۰۲۱۸۲۸۸۳۸۳۸

پست الکترونیک: dalimi_a@modares.ac.ir

تایپی پذیرش نهایی: ۹۲/۶/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۲

اضافه کردن دارو تعداد انگل شمارش شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. همچنین، در هر پلیت سه چاهک فقط دارای پروماستیگوت و محیط بوده و قادر آلوئه امودین بود که این چاهک‌ها به عنوان کنترل آزمون در نظر گرفته شدند [۲۰]. آلوئه امودین پس از ۲۴ ساعت با استفاده از نرم‌افزار ۵ GraphPad Prism محاسبه شد.

بررسی فعالیت کشنده‌گی آلوئه امودین بر پروماستیگوت‌ها به وسیله آزمایش MTT

پروماستیگوت‌های انگل در محیط ۱۶۴۰ RPMI حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شدند و زمانی که تعداد پروماستیگوت به 1×10^7 انگل در هر میلی‌لیتر رسید، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مذکور در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. به چهار چاهک پلیت ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد تا از تبخیر در چاهک‌های حاوی سلول جلوگیری به عمل آورد. در سه چاهک مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI ۱۶۴۰+۱۶۴۰ درصد سرم جنین گاوی ریخته شده و به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن آلوئه امودین به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول dimethyl thiazolyl-2-(2,5-diphenyle tetrazolium bromide) [با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر] اضافه شد و پس از انجام مراحل پایانی، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader; DA 3200) خوانده شد و نتایج آزمایش به صورت OD محاسبه گردید. درصد زنده بودن سلول از طریق فرمول زیر محاسبه شد: $\text{جزب نوری چاهک بلانک, AC} / \text{جزب نوری چاهک کنترل AB} = \text{جزب نوری سلول تیمار شده با دارو} / \text{جزب نوری سلول زنده}$ [۲۱].

بررسی الق آپوپتوz پس از افزودن دوزهای مختلف دارو به وسیله فلوسایتومتری

در این آزمون از کیت Annexin V-FITC Apoptosis Detection (Biovision;USA) استفاده شد. انگل‌های مواجه شده با غلظت‌های مختلف آلوئه امودین جمع-آوری شده و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه (به مدت ۵ دقیقه) سانتریفیوژ شدند. پس از حذف مایع رویی به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر از بافر بایندینگ (Binding)، ۵ میکرولیتر از محلول Annexin-V و نیز ۵ میکرولیتر از محلول PI اضافه شد و سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکویه شد [۲۲]. شدت رنگ جذب شده توسط سلول‌ها با استفاده از دستگاه BD FACSCanto II Flow cytometer در گروه

دارد [۱۱،۱۰]. وجود آلکالوئیدها، تری‌ترپین‌ها، سیانیدین‌ها، پروآنثی سیانیدین‌ها، تانن‌ها، ساپونین و استروئیدها در عصاره این گیاه اثبات شده است که حضور این مواد می‌تواند اثرات ضد انگلی گیاه را توجیه کند [۱۰،۹]. در سال ۲۰۱۱ توسط Fernanda و همکارانش اثر آلوئه ورا بر روی لیشمانا اینفانتوم بررسی شد و غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ از دارو به میزان ۶۵ درصد از رشد انگل ممانعت کرد [۱۲]. محققین غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۲۲۵ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آلوئه‌ورا را بر لیشمانا دونووانی اثر دادند و مشاهده نمودند که غلظت ۳۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ بیش از ۸۰ درصد از رشد انگل ممانعت می‌نماید [۱۴،۱۳]. آلوئه امودین یکی از ترکیبات اصلی و موثر برگ گیاه آلوئه ورا می‌باشد که فعالیت ضد توموری آن بر روی سلول‌های لوسی [۱۵]، سلول‌های هپاتوما [۱۶] و سلول‌های پرومیلوسمیک [۱۷] گزارش شده است. آلوئه امودین با تغییر در میزان پروتئین‌های FACL BCL2 BAX caspase3,8,9 [۱۹] و فعال کردن C [۱۹] باعث القای آپوپتوz می‌شود. تا به حال مطالعه‌ای جامع جهت بررسی تاثیر آلوئه امودین بر انگل لیشمانا مازور انجام نشده است. در مطالعه حاضر اثربخشی آلوئه امودین بر پروماستیگوت‌های لیشمانا مازور و القای آپوپتوz به واسطه این ماده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر مطالعه‌ای تجربی است. آلوئه امودین به صورت پودر از شرکت Selleckchem خردباری شد و محلول استوک به غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر DMSO تهیه شد و با استفاده از محیط کشت (RPMI ۱۶۴۰) (Memorial Institute Roswell Park) غلظت‌های ۱۶۰، ۱۲۰، ۸۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. لیشمانا مازور سویه MRHO/IR/75/ER از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی راژی تهیه شده و ابتدا در محیط NNN کشت داده شد. در ادامه جهت افزایش تعداد انگل، پروماستیگوت‌های لیشمانا مازور در محیط RPMI ۱۶۴۰ کشت داده شدند.

بررسی میزان اثر بخشی دارو بر اساس شمارش تعداد انگل پروماستیگوت‌های انگل در محیط ۱۶۴۰ RPMI حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شدند و زمانی که تعداد پروماستیگوت به 1×10^7 انگل در هر میلی‌لیتر رسید، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مذکور در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. آلوئه امودین در غلظت‌های ۱۶۰، ۱۲۰، ۸۰، ۴۰ و ۲۲ ساعت پس از

آزمون MTT

در صد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با دارو ۴۸، ۲۶ و ۷۲ ساعت پس از کشت با استفاده از آزمون MTT محاسبه شد. نتایج در جدول شماره ۲ آورده شده است. ۷۲ ساعت پس از کشت در بالاترین غلظت (۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر) ۱۹/۷ درصد سلول‌ها زنده ماندند.

بررسی آپوپتوز در پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور با استفاده از فلوسایتومتری

آنالیز نتایج نشان داد که آلوئه امودین باعث آپوپتوز اولیه و تاخیری در پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور می‌شود. ۲۶ ساعت پس از کشت در غلظت ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر در صد سلول‌های دچار آپوپتوز (اولیه و تاخیری) ۶۸/۳ بود که از این میزان ۴۷/۱ در صد تنها آنکسین مثبت بودند و ۲۱/۲ در صد آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت بودند؛ در حالی که در گروه آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت بودند. هم‌چنین بیشترین میزان آپوپتوز اولیه و تاخیری (۷۴/۱ در صد) ۷۲ ساعت پس از کشت در غلظت ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داده شد (تصویر شماره ۱).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آلوئه امودین باعث کاهش تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور می‌شود. مقایسه تعداد انگل در گروه کنترل با گروه‌های تست در زمان‌های مختلف نشان داد که اثر بخشی آلوئه امودین بر پروماستیگوت‌های انگل وابسته به غلظت و زمان می‌باشد و با افزایش غلظت آلوئه امودین و زمان تاثیر، تعداد انگل نیز کاهش می‌یابد. ۲۶ ساعت پس از کشت بیشترین اثر ممانعت کنندگی از رشد انگل در غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر دیده شد که تعداد انگل ۳۱۰۰۰ شمارش شد؛ در حالی که در گروه کنترل این مقدار ۱۲۵۰۰۰ بود. با استفاده از نتایج شمارش انگل IC50 آلوئه امودین ۵۲/۷۹ ساعت ۲۶ پس از کشت آمده از آزمون MTT نیز میلی لیتر محاسبه شد. مقادیر به دست آمده از آزمون MTT نشان داد در صد پروماستیگوت‌های زنده با افزایش غلظت آلوئه امودین و زمان تاثیر کاهش می‌یابد. کمترین درصد سلول‌های زنده ۷۲ ساعت پس از کشت در غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر دیده شد.

ایمنی شناسی دانشگاه تربیت مدرس خوانده شد و در نهایت نتایج توسط نرم افزار FlowJo آنالیز شد. لازم به ذکر است نمونه‌های کشت داده شده با آلوئه امودین پس از ساعت‌های ۲۶، ۴۸ و ۷۲ برای آزمایش‌های فلوسایتومتری جمع‌آوری شدند. در صد سلول‌های دچار آپوپتوز اولیه شده (آنکسین مثبت)، سلول‌های دچار آپوپتوز تاخیری (آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت)، سلول‌های دچار نکروز شده (پروپیدیوم یداید مثبت) و سلول‌های زنده (آنکسین و پروپیدیوم یداید منفی) در سه غلظت ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر آلوئه امودین و در سه زمان مذکور تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز و مقایسه نتایج ابتدا آزمون نرمالیته کولمو-گروف اسمیرنوف انجام شد و سپس از آزمون t برای مقایسه نتایج گروه‌های تست با گروه کنترل استفاده شد.

نتایج

پس از گذشت ۲۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل، شمارش تعداد انگل نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف آلوئه امودین با گذشت زمان تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌باید که تعداد آنها در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱). آلوئه امودین پس از ۲۶ ساعت ۵۲/۷۹ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار تعداد پروماستیگوت‌ها در آزمون ممانعت از رشد انگل

آلوئه امودین	تعداد پروماستیگوت (× ۱۰ ^۶)
(میکروگرم بر میلی لیتر)	
۴۰	۰/۵۸±۰/۰۴
۸۰	۰/۴۳±۰/۰۳
۱۲۰	۰/۳۲±۰/۰۴
۱۶۰	۰/۲۵±۰/۰۲
کنترل	۱/۰±۰/۲
	۱/۳۷±۰/۰۱
	۰/۲۸±۰/۰۳
	۰/۳۱±۰/۰۱
	۱/۲۵±۰/۱
	۱/۳۷±۰/۱

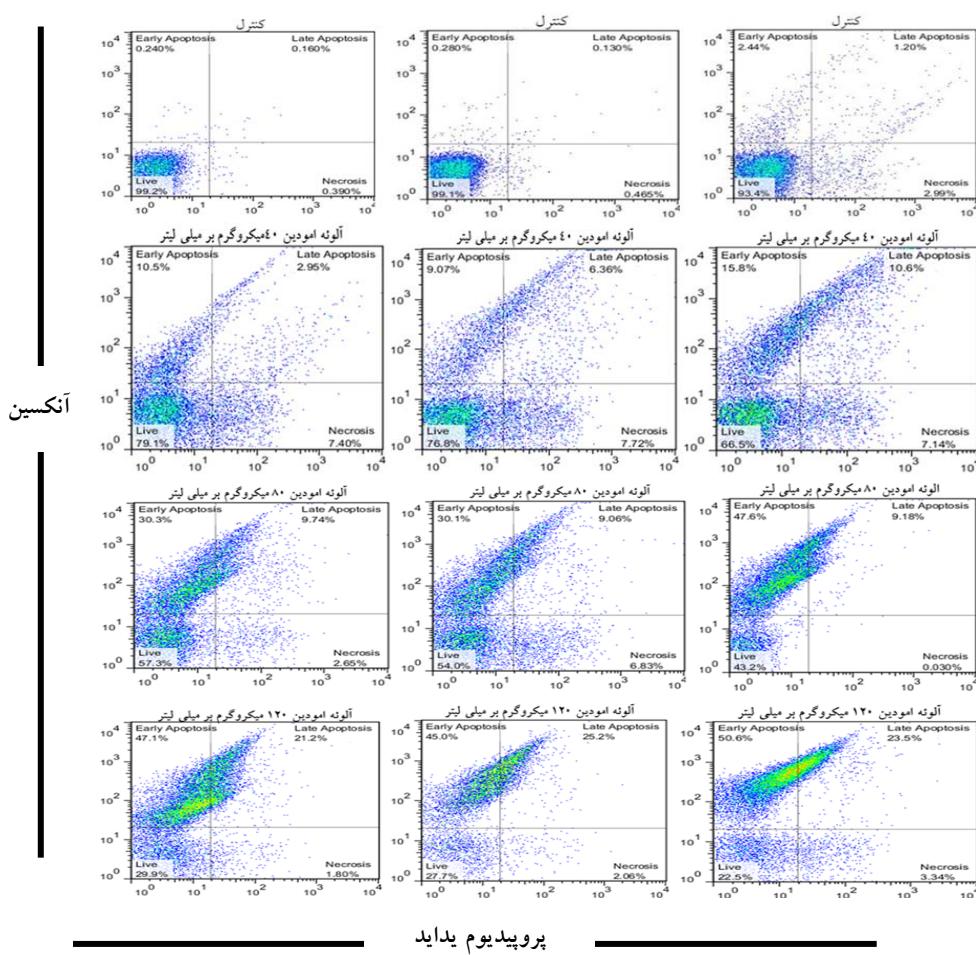
نتایج نویق میانگین سه بار تکرار است. اختلاف بین تعداد انگل در گروه‌های تست با گروه کنترل (گروه دارای انگل و فاقد آلوئه امودین) معنی دار است ($P < 0.05$).

جدول شماره ۲- در صد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از مواجه با دارو

آلوئه امودین	در صد پروماستیگوت‌های زنده
(میکروگرم بر میلی لیتر)	
۴۰	۴۶
۸۰	۴۱
۱۲۰	۳۶/۴
۱۶۰	۲۴/۲

۷۲ ساعت

۴۸ ساعت



تصویر شماره ۱- نتایج فلوسایوتومتری در لیشمانیا مازور پس از افزودن غلظت‌های مختلف آلوئه امودین در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت. با افزایش زمان و غلظت آلوئه امودین القا آپوپتوز (اولیه و تاخیری) در پروماستیگوت‌های انگل افزایش یافت. در تصویر درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز تاخیری و نکروز در چهار منطقه مجزا نشان داده شده است.

آنکسین متصل می‌شود و در ادامه سلول‌هایی که دجاج تخریب بیشتری شده‌اند دزوکسی ریبونوکلیک اسید (DNA) آنها به پروپیدیوم یداید متصل می‌شود و انگل به هر دو رنگ پاسخ مثبت می‌دهد. مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته بیشتر در مورد بررسی نقش ضد سلطانی آلوئه امودین است. آلوئه امودین در سلول‌های سلطانی رحم چرخه سلولی را در مرحله G2/M متوقف کرده و باعث فعال شدن آلکالن فسفاتاز می‌شود [۲۳]. هم‌چنین، در سلول‌های سلطانی معده با آزاد کردن سیتوکروم C و فعال کردن کاسپاز-۳ باعث القای آپوپتوز می‌شود [۲۴]. در سلول‌های سلطانی مغز نیز با تغییر در ایزوآنزیم‌های پروتئین کیناز C از تکثیر سلولی مانع شده و آپوپتوز را القا می‌کند [۲۵]. در مطالعات گذشته القای آپوپتوز در لیشمانیا با استفاده از داروی میلتوفوسین بررسی شده است [۲۶]. هم‌چنین، القای آپوپتوز توسط

یافته‌های تحقیق نشان داد که آلوئه امودین باعث رخداد آپوپتوز در پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور می‌شود که این اثر وابسته به غلظت دارو و زمان می‌باشد؛ به گونه‌ای که با افزایش غلظت و زمان اثرگذاری آلوئه امودین میزان آپوپتوز هم افزایش می‌یابد. بیشترین میزان آپوپتوز در غلظت ۱۲۰ میکروگرم برمیلی لیتر ۷۲ ساعت پس از کشت رخ داد که ۵۰/۶ درصد آپوپتوز اولیه و ۲۳/۵ درصد آپوپتوز تاخیری بود. نتایج فلوسایوتومتری نشان می‌دهد که در هر غلظت استفاده شده از آلوئه امودین با افزایش زمان، میزان آپوپتوز تاخیری افزایش می‌یابد؛ در واقع با گذشت زمان درصد سلول‌هایی که اتصال آنها به هر دو رنگ آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت باشند، افزایش می‌یابد که این امر نشان دهنده روند تاثیر گذاری آلوئه امودین بر ساختمان سلولی انگل است. در ابتدای روند آپوپتوز فسفاتیدیل سرین موجود در غشا سلول به

این رو، انجام مطالعات بیشتر در شناسایی مکانیزم دقیق اثر بخشی این ماده و نیز مطالعات درون‌تنی می‌تواند در دست‌یابی به دارو و یا ترکیبات دارویی مناسب در درمان لیشمانیازیس جلدی مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسنده‌گان مقاله به‌خاطر تامین هزینه‌های طرح مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

References:

- [1] Simranjeet K, Hitesh P, Virag S, Prabha G, Nilanjan R. *Leishmania major* structural database. *IJIB* 2009; 7(2): 63-8.
- [2] Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 363-70.
- [3] Pearson RD and Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1-13.
- [4] Pujals G, Suñé-Negre J, Pérez P, García E, Portus M, Tico J, et al. In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* 2008; 102: 1243-7.
- [5] Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002; 8(4): 319-42.
- [6] Berman JD. Human leishmaniasis: clinical Diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 684-703.
- [7] Brodskyn C, De Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 705-17.
- [8] Patrícia SL, Tatiana ST, Luis Gustavo M, Paloma K M, Nakamura T, Benedito , et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (*L.amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*). *RBCF* 2005; 41: 85-94.
- [9] Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 3-37.
- [10] Nari Y, Chan-Ho L, Sun-Mee L. Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1341-8.
- [11] Choi S, Son W, Son Y. W, Park Y, Lee S, Chung M. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. *Br J Dermatol* 2001; 145: 535-45.
- [12] Fernanda C, Bevilacqua C, Accioly M, Morais S, Andrade H, Machado L, et al. In vitro effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Vet Parasitol* 2011; 178: 235-40.
- [13] Avijit D, Goutam M, Chitra, Mitali C. In vitro antileishmanial activity of *Aloe vera* leaf exudate: A potential herbal therapy in leishmaniasis. *Glycoconj J* 2007; 24: 81-6.
- [14] Avijit D, Debjani S, Ameenah G, Chitra M, Mitali C. In vitro and in vivo activity of *Aloe vera* leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2008; 102: 1235-42.
- [15] Chen HC, Hsieh WT, Chang WC, Chung JC. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(8): 1251-7.
- [16] Kuo P, Lin T, Lin C. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53 dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci* 2002; 71: 1879-92.
- [17] Chen Y, Shen S, Lee W, Hsu F, Lin H, Ko C, et al. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1713-24.
- [18] Lee H, Hsu S, Liu M, Wu C. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 287-95.
- [19] Lee H. Protein kinase C involvement in aloe-emodin and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 11-20.
- [20] Ebrahimisadr P, Ghaffarifar F, Hassan ZM, Beheshti N. The effect of artemether-induced apoptosis in promastigotes of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) under in-vitro conditions. *Modares J Med Sci Pathol* 2012; 15(2): 1-10.
- [21] Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosin induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 2007; 116: 1-13.
- [22] Marufi Y, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z, Hassan ZM. Cantharidin-induced apoptosis in گیاه Allium sativum بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا مژور با استفاده از فلوزایتمتری اثبات شده است [۲۷]. محققین هندی نشان دادند که عصاره گیاه آلوئه‌ورا در روند اثر بخشی بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا دونووانی باعث القای آپوپتوز در این انگل می‌شود [۲۸]. مکانیسم القای آپوپتوز در پرماستیگوت‌های لیشمانیا مژور بواسطه آلوئه امودین هنوز مشخص نیست.

نتیجه‌گیری

آلوئه امودین بر روی پرماستیگوت‌های لیشمانیا مژور اثر کشنده‌گی داشته و نیز باعث القای آپوپتوز در انگل می‌شود. از

- Leishmania major* promastigotes and macrophages infected by *Leishmania major* amastigotes in-vitro. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22(87): 33-40.
- [23] Xiao B, Guo J, Liu D, Zhang S. Aloe-emodin induces in vitro G2/M arrest and alkaline phosphatase activation in human oral cancer KB cells. *Oral Oncology* 2007; 43(9): 905-10.
- [24] Chen SH, Lin KY, Chang CC, Fang CL, Lin CP. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(11): 2296-230.
- [25] Acevedo-Duncan M, Russell C, Patel S, Patel R. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(14): 1775-84.
- [26] Caroline P, Philippe ML, Christian B, Jacqueline B. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(3): 852-9.
- [27] Khademvatan SH, Saki J, Gharavi MJ and Rahim F. Allium sativum extract induces apoptosis in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) promastigotes. *J Med Plant Res* 2011; 5(16): 3725-32.
- [28] Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 2007; 56: 629-36.