فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۴، جلد ۱۴، شماره۳، تابستان ۱۴۰۰، صفحه۲۹ تا ۴۱
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

اثرات عصاره هیدروالکلی دانه زیتون تلخ(*Melia azedarach*) و چریش(*Azadirachta indica*) بر روی تعداد *Trypanosoma evansi* در کبد موش آلوده

شهرزاد نصیری سمنانی[1]، نسترن قاسم پور[2]

۱- استادیارگروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه- مهندسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان،ایران.sh.nasiri92@yahoo.com

۲-دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه، ایران. ng.nastaranghassempoor2060@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۲/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: تریپانوزوموز ناشی از *Trypanosoma evansi* موجب عفونت در پستانداران اهلی و هم چنین انسان می گردد. درمان تریپانوزوموز دارای محدودیت هایی از جمله مقاومت به دارو های شیمیایی می باشد. هدف از مطالعه حاضر مقایسه اثرات عصاره-های هیدرو الکلی دانه های چریش و زیتون تلخ در برابر عامل مقاوم این بیماری در کبد موش های آلوده به *Trypanosoma evansi* است.

روش کار: پس از جمع آوری و شناسایی گیاهان چریش و زیتون تلخ، به روش پرکوله از دانه های آن ها عصاره هیدروالکلی تهیه و پس از تغلیظ ۱۰۰ تا ۵۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن موش به صورت صفاقی به موش های صحرایی نر آلوده شده با ۳×۱۰^{۷} *Trypanosoma evansi* به مدت ٦٠ روز تزریق گردید. برای تعیین تعداد پارازیت از روش روتین استفاده شد. آزمایشات آسیب شناسی بافتی کبد بعد از رنگ آمیزی هماتوکسیلن وائوزین انجام و ارزیابی آماری با استفاده از آزمون های آنالیز واریانس ANOVAو با استفاده از نرم افزار Prism انجام گرفت و حد خطای$p< ۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی دار پذیرفته شد.

یافته‌ها: عصاره دانه چریش و زیتون تلخ هر دو موجب کاهش تعداد انگل شده ودر مقایسه بین دو عصاره میزان اثر کاهشی زیتون تلخ نسبت به چریش بیشتر بوده است($p< ۰/۰۵$). تغییرات احتقان، انحطاط چربی، واکوئولار انحطاط، نکروز و نفوذ سلولی در کبد گروه کنترل مثبت نسبت به گروه های تیمار شده بیشتر بود.

نتیجه گیری: استفاده از عصاره های هیدرو الکلی دانه های چریش و زیتون تلخ در مقدار معین داروی گیاهی موثر در بیماری تریپانوزوموز(سوررا) می شود.

واژه‌های کلیدی: کبد، *Trypanosoma evansi* ، عصاره زیتون تلخ، عصاره چریش.

مقدمه

تریپانوزوم‌ها تک یاخته‌هایی کوچک، متحرک و دوکی‌شکل جز تاژکداران انگلی بوده و بیشتر در خون مهره داران دیده می شوند. سوررا(تریپانوزومیازیس) که در اثر عفونت با تک یاخته ای متعلق به جنس تریپانوزوم(*Trypanosoma evansi*) ایجاد می گردد، بومی منطقه جنوب شرقی آسیا از جمله اندونزی است. گونه *Trypanosoma evansi* دارای طیف وسیعی میزبان مانند بز، گوسفند، خوک، سگ، گربه و سایر حیوانات وحشی می‌باشد(۳۲، ۱۷). *T. evansi* برای حیوانات آزمایشگاهی(موش ، موش و خرگوش) بسیار بیماری زا است(۵۱، ۴۸، ۳۹، ۹). این بیماری نه از تنها ضررهای اقتصادی مانند کاهش رشد دام و کاهش دام تولید، بیماری و مرگ و میر(۱) بلکه عفونت *T. evansi* می تواند باعث سرکوب سیستم ایمنی یا کاهش پاسخ ایمنی شود(۲). سوررا تأثیر منفی بر جمعیت بوفالو در فیلیپین داشته و رشد جمعیت گاومیش در مناطق بومی در مقایسه با مناطقی که

این گونه نیستند ۵۰ درصد کاهش می یابد(۵۱). این انگل از گلوکز و اکسیژن برای رشد و تکثیر خود استفاده می-کند و منجر به از بین رفتن این متابولیت ها و تغییرات دژنراتیو در میزبان می گردد. تغییرات بیشتر در اندام ها یا به دلیل آسیب سلولی ناشی از سموم آزاد شده توسط انگل، و یا به دلیل واکنش¬های ایمونولوژیکی ایجاد می-شود. اگرچه *T. evansi* یک هموپروتوزوآ است ولی در اندام های احشایی مختلف موش ها به ویژه در داخل رگ‌های خونی در قلب، لوب های بینایی، مغز، کبد، کلیه و ریه اثرات تخریب بافتی داشته و این انگل برای موش-های آلبینو سوئیسی بیماری زا و موجب مرگ آن می-شود(۴۷، ۳۱، ۱۸). گزارش شده است که تغییرات در کلیه‌ها عمدتاً به دلیل سموم تولید شده توسط انگل و تجمع آن منجر به اختلال در ساختار و عملکرد کلیه می-شود(۱۸). تغییرات دژنراتیو در قلب ممکن است به دلیل کم خونی و افت قند خون می باشد(۱۸). مغز تغییرات دژنراتیو خفیفی همراه با احتقان عروق خونی مننژ را نشان می¬دهد. تریپانوزوم ها در عروق خونی مغزی متراکم بوده وتغییرات مغز ممکن است به دلیل مواد سمی آزاد شده توسط انگل باشد. گزارش شده است که تغییرات پاتولوژیک در مغز به دلیل تحریک مداوم ناشی از وجود انگل ها یا سموم آزاد شده از آن ها است نیز با وجود تریپانوزوم ها در رگ های خونی مغز در موش های بسیار آلوده برخی از پژوهشگران بر این عقیده اند که به جای واکنش ایمنی با واسطه سلول، این مجموعه های ایمنی هستند که در انحطاط مغز و سایر اندام¬ها نقش دارند(۴۶، ۴۲). مننژانسفالیت لنفوپلاسماسیتیک خفیف از سگ، بزها و بوفالوها در عفونت *T. evansi* گزارش شده است(۵۳، ۳۰). احتقان و ادم ریه ها عمدتاً به دلیل واکنش التهابی ریه‌ها به انگل و در نتیجه اتساع عروق و ترشح بود(۱۸، ۹). در بیماری سوررا، داروهایی که دارای خواص ضد تریپانوزومی هستند معمولاً پس از ایجاد عفونت تجویز می‌شوند(۴۳ ، ۱۳). کنترل *T. evansi* با مصرف آنتی تریپانوزومال(سورامین) انجام می گیرد ولی به علت مقاومت دارویی تریپانوزوم به ایزومتامیدیوم و دیمینازن استات کنترل بیماری سخت گردیده است(۳۷) واکسیناسیون علیه عفونت *T. evansi* وجود ندارد، عمدتاً بر اساس پدیده تنوع آنتی ژنی تریپانوزوم ها به طور کلی داروهای ضدتریپانوزومی دی آمیدین های معطر جدید است(۵۶، ۴۹، ۱۶).گیاهان دارویی از زمان طلوع تمدن، بخشی از جامعه بشری برای مبارزه با بیماری ها هستند.گیاه *Azadirachta indica* A. Juss و *Melia azadirachta* در هند و کشورهای همسایه به عنوان یکی از کاربردی-ترین گیاهان دارویی با طیف گسترده ای از فعالیت های بیولوژیکی به بیش از ۲۰۰۰ سال، در داروهای ayurveda, homoeopathic, unani مورد استفاده قرار گرفته است و به یک داروی مدرن پزشکی تبدیل شده است. Nimbidin، عمده ترین ماده تلخ خام که از روغن هسته دانه *A. indica* استخراج می شود، فعالیت های بیولوژیکی متعددی را نشان می دهد. از این ماده خام، برخی از تترانورتریترپن ها، از جمله nimbin, nimbinin, nimbidi- nin, nimbolide , nimbidic acid جدا شده است(۴۵، ۳). Nimbidin و sodium nimbidate دارای فعالیت ضد التهابی وابسته به دوز قابل توجهی در برابر ادم حاد ناشی از کاراگنینین(carrageenan) و آرتروز ناشی از فرمالین در پنجه موش صحرایی هستند. Nimbidin هم چنین با جلوگیری از رشد *Tinea rubrum* فعالیت ضد قارچی را نشان داد و در شرایط آزمایشگاهی مشخص شد که این ماده ضد باکتری است و می تواند رشد مایکوباکتریوم توبروکولوز را مهار کند(۲۷). مشخص گردیده کهAzadirachtin دارای فعالیت ضد تغذیه ای قوی و خاصیت ضد مالاریاست(۲۸، ۲۴، ۱۹). به طوری که این ماده باعث مهار توسعه انگل های مالاریا می‌شود(۲۲). دو پلی ساکارید دیگر ، GIIa و GIIIa جدا

شده از پوست *M. azadirachta* نیز اثر ضد التهابی قابل توجهی بر ادم ناشی از کاراگینان (carrageenin) در موش‌ها نشان داد(۱۵). عصاره دانه چریش و اجزاء خالص شده آن از رشد و نمو مراحل غیرجنسی و جنسی سویه‌های حساس و مقاوم به دارو انگل مالاریا *P. falciparum* جلوگیری می کند(۱۴). آزمایش تغذیه ای دیگری روی جوجه ها با اغذیه ی پودر دانه چریش(٪ ۲/۵) تغییرات خفیف تا شدید را در کلیه، کبد ، طحال ، روده و قلب آن‌ها نشان داد(۲۱). عصاره آبی مغز دانه چریش(۱ میلی لیتر/۱۰۰ گرم وزن بدن،روزانه ۵۰ گرم در لیتر محلول) باعث مهار تریپسین در موش های از شیر گرفته شده، می شود.(۴۰، ۲۱). گوساله هایی که با کیک دانه چریش تغذیه می شوند، افزایش میزان هموگلوبین خون همراه با کاهش افسردگی را نشان داده است(۴۰). جوجه های قهوه‌ای ۷ الی ۳۵ روز پس از تولد هنگامی که با رژیم غذایی حاوی ۲ الی ۵ درصد حاوی برگ چریش تغذیه می شوند، دچار نفروپاتی کبدی و تغییرات قابل توجهی در پارامتر های خون می شوند(۵۲). Nimbolide و نیمبیک اسید(nimbic acid) در دوز کشنده باعث مرگ اکثر حیوانات به دلیل اختلال در عملکرد کلیه، روده باریک و کبد و نیز افت شدید و ناگهانی فشار خون شریانی می شود. Nimbidin، deacetyl nimbin و azadirachtin عملاً غیر سمی هستند(۱۹). به همین لحاظ هدف از این پژوهش بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی دانه زیتون تلخ(*Melia azedarach*) و چریش(*Azadirachta indica*) بر روی تعداد *Trypanosoma evansi* در کبد موش آلوده است.

مواد و روش ها

تریپانوزوما اوانسی

Trypanosoma evansi مورد استفاده در این مطالعه محلی بوده و به روش ماکرو هماتوکریت از خون شتر آلوده از منطقه کهنوج کرمان گرفته و در نیتروژن مایع ذخیره گردید. تمام گروه های تحت مطالعه باتزریق درون صفاقی ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)آلوده شدند(۳۴).

تهیه نمونه گیاهی و عصاره گیری

در این تحقیق میوه چریش در شهریور ماه ۱۳۹۹از شهر بندرعباس، استان هرمزگان و میوه زیتون تلخ در آذرماه سال ۱۳۹۹از شهر زنجان جمع آوری گردید. نمونه‌های هرباریومی جهت شناسایی، کدگذاری و نگهداری به هرباریوم دانشکده تحویل گردیدند(چریش با شماره . ۶۱۴ Z.U.Aو زیتون تلخ با شماره ۶۴۱ Z.U.A). میوه ها در مجاورت هوا و دور از نور مستقیم خورشید خشک و دانه های ان جدا گردیدند. سپس دو کیلوگرم ازدانه های هر یک از نمونه ها توسط دستگاه آسیاب نیمه صنعتی به خوبی خرد و به پرکولاتور منتقل گردید. عمل استخراج عصاره به وسیله اتانول ٪۷۰ چهار مرتبه و هر بار به کمک۳لیتر حلال، به مدت یک ماه برای هر یک از نمونه ها انجام گردید. به کمک دستگاه چرخان تقطیر در خلاء ,Buchi(Germanyمدل ، RE 120)عصاره های حاصل تغلیظ و تا زمان انجام آزمایش در ظروف تیره و دربسته، دریخچال نگهداری گردیدند(۲۰).

حیوانات

تعداد ۶۰موش صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم و سن حدود ۵۵-۶۵ روز جهت انجام این تحقیق استفاده گردید. حیوانات در محل حیوان خانه دانشکده تحت شرایط استاندارد دمایی۲±۲۶ درجه سانتی گراد، سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ساعته و دسترسی آزاد به آب وغذا به مدت چهار هفته نگهداری شدند.

گروه بندی حیوانات

تعداد ۶۰موش نر به طور تصادفی به ۶گروه۶ تایی در دودسته به شرح زیر تقسیم شدند:

دسته الف شامل: گروه ۱ کنترل مثبت(تنها آلوده شده با انگل) و منفی آلوده نشده با انگل و تیمار شده با ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن موش نرمال سالین به مدت ۶۰ روز از راه تزریق زیر دریافت کردند. گروه دوم تا پنجم به ترتیب ۱۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و۵۰۰mg/kg عصاره دانه چریش به مدت۶۰ روز از طریق زیرجلدی دریافت کردند(۵۰، ۳۷). دسته ب شامل گروه ۱ کنترل مثبت(تنها آلوده شده با انگل) و منفی آلوده نشده با انگل و تیمار شده با ۱میلی لیتر بر کیلوگرم وزن موش نرمال سالین به مدت ۶۰ روز از راه تزریق زیر دریافت کردند. گروه دوم تا پنجم به ترتیب ۱۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و۵۰۰mg/kg عصاره دانه زیتون تلخ به مدت۶۰ روز از طریق زیرجلدی دریافت کردند(۵۷، ۳۶). در پایان تیمار پس از خون گیری همه موش ها با اتاناسیون اتر بیهوش و کشته شدند تا نمونه های کبد برداشته گردد. آماده سازی بافت شناسی با استفاده از هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی و اسمیر نمونه ها نیز تهیه گردید. تعداد انگل های در خون جمع آوری شده با استفاده از

فرمول به کمک لام نئوبار شمارش گردید

$$\text{Numer of parasite/mL} = A \times B \times 10^4$$

A = number of parasites counted, B = dilution factor

آماده سازی سیتولوژیکی

آماده سازی سیتولوژیکی کبد با استفاده از روش اسمیر با رنگ آمیزی Giemsa و مشاهده با بزرگنمایی ۱۰۰۰انجام شد(۸). برای به دست آوردن متوسط تعداد *T. evansi* هر موش ۱۰ میدان دید بود. داده های مشاهده شده با استفاده از ANOVA(تجزیه و تحلیل واریانس) و با آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت $\alpha = 0.05$.

آماده سازی بافت شناسی

پس از اتمام تیمار از گروه های مختلف نمونه کبدی برداشته و در فرمالین ۱۰٪ غوطه ور گردید.در ادامه نمونه-های تثبیت شده از طریق روش پارافین آماده برای برش گیری(۵میکرون ضخامت) و رنگ آمیزی متداول هماتوکسیلین – ائوزین لام ها برای مشاهده میکروسکوپی بافت آماده گردید(۱۶).

تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی

پس از پایان تیمار تمام تیمارها مجدداً توزین وبا کلروفرم بیهوش و پس از خون از قلب کشته شدند.سرم خون های جمع آوری شده برای آزمایشات بیوشیمایی جدا شده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد ذخیره گردید. نمونه هایی از بافت و خون کبد در ظرف محتوی نرمال سالین همگن شده باتریس ۰/۱ نرمال(۷/۴) برای سنجش MDA، GPx و SOD (Challopadhyay و Bandyopadhyay 2005) قرار گرفت(۱۰).

سنجش آنزیم ها

سنجض AST با استفاده از رایتمن و فرانکل انجام شد روش(۳۵) در حالی که ALT با روش کینگ و کینگ اندازه گیری شد(۳۶). مالون دی آلدئید(MDA) با روش آلبرو و همکاران(۶)تعیین شد. GPx با استفاده از روش Paglia تعیین شدو ولنتاین (۱۲)، در حالی که روش ولیامز و همکاران برای SOD استفاده شد(۵۳).

نتایج

مشاهده میکروسکوپی نشان داد که کبد موش های صحرایی آلوده به *T. evansi* تیمار شده با عصاره های دانه چریش و زیتون تلخ از ۱۰۰-۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش معنی داری در میزان خون ریزی، هایپرمی، نفوذ سلول های التهابی، انحطاط و نکروز داشته است(جداول ۱ و ۲). نتایج تجزیه و تحلیل آماری پارامترهای بافتی مشاهده شده با استفاده از آزمون دانکن در جداول ارائه شده است. نتایج مقایسه ای بین دو نوع عصاره تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ولی شدت تاثیر عصاره دانه زیتون تلخ نسبت به عصاره دانه چریش در اکثر موارد بیشتر بود. داده های جداول نشان می دهد که موش-های موجود در شاهد منفی علاوه بر عدم خون ریزی، هایپرمی و نفوذ لوکوسیت، بیشترین تعداد سلول های کبدی نرمال و کمترین نکروز را در مقایسه با موش های

آلوده به *T. evansi*، بدون درمان(مثبت کنترل) و یا گروه-های تحت تیمار داشته اند. در گروه کنترل مثبت عفونت *T. evansi* به طور قابل توجهی تعداد سلول های کبدی طبیعی را کاهش داده و منجر به خون ریزی متوسط، هایپرمی، نفوذ لوکوسیت ها، تخریب چربی و نکروز می-شود. تجویز عصاره دانه چریش در محدوده ۱۰۰ - ۳۰۰میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن نمی تواند کبد موش ها را از اثرات منفی عفونت *T. evansi* محافظت نماید، همان طور که اختلاف معنی داری را از نظر هایپرمی، نفوذ لوکوسیت ها، تخریب چربی و نکروز نشان داده نشده است. دوزهای ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره های دانه¬های چریش و زیتون تلخ اثرات محافظتی بر کبد موش های صحرایی آلوده به *T. evansi* داشته و در مقایسه با کنترل مثبت تعداد افزایش سلول های کبدی طبیعی، کاهش هموراژه، پرخونی، نفوذ لوکوسیت‌ها و نکروز داشته است. رشد *T. evansi* در کبد موش های آلوده شده گروه کنترل منفی به طور معنی‌داری نسبت به گروه های تیمار با عصاره ها بیشتر می باشد، اما رشد عامل عفونت در دوزهای بالاتر تیمار به مقدار کمتر قابل مشاهده می باشد(جدول۳). جدول ۴ و۵ نشان می-دهند افزایش وزن موش ها در گروه های تحت تیمار نسبت به وزن موش های آلوده شده در کنترل مثبت مشاهده می گردد(p <۰/۰۵).اختلاف معنی داری در سطح آنزیم های کبدی AST، ALT، ALP، GPx، SOD و MDA در گروه های تیماری نسبت به خود و کنترل منفی و مثبت وجود دارد(p <۰/۰۵).

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نتایج به دست آمده بوسیله¬ی آزمون آماری Kruskal-Wallis non parametric ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند زمانی که ارزش P کمتر از ۰/۰۵ شد، دوباره با آزمون آماری Mann-Whitney U test موردتحلیل آماری قرار گرفتند. در این آزمون اگر مقادیر کمتر از ۰/۰۵ (P≤۰/۰۵) بود، از نظر آماری معنی¬دار تلقی شد. برای انجام تست‌های آماری از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

جدول ۱- اثر عصاره اتانولی دانه چریش بر روی شاخص های بافتی کبد در موش های آلوده شده با تریپانوزوم اوانسی

عصاره اتانولی دانه چریش	(K0)	(K1)	(K2)	(K3)	(K4)	(K5)
٪بازدارندگی رشد انگل	۰	۰	۱۴/۶۴	۲۳/۷۸	۵۸/۶۸	۸۰/۵
سلول های نرمال	۶۳/۶۵ ± ۹/۵۹^{a}	۲۷/۲۵ ± ۷/۳۲^{a}	۳۵/۱۵ ± ۴/۸۷^{bc}	۴۲/۹ ± ۴/۲۶^{c}	۵۱/۲۵ ± ۲/۴۵^{a}	۵۶/۰۰ ± ۱/۳۶^{a}
میزان خونریزی	۰	۹/۳۰ ± ۱/۸۱^{bc}	۸/۶۰ ± ۳/۸۲^{c}	۷/۷۵ ± ۲/۳۶^{c}	۵/۳۰ ± ۱/۴۱^{d}	۴/۰۵ ± ۰/۱۰^{d}
هایپرمی	۰	۲/۳۵ ± ۰/۵۷^{b}	۲/۷ ± ۰/۵۵^{b}	۲/۱۵ ± ۰/۵۷^{bd}	۱/۲۵ ± ۰/۶۸^{d}	۱/۵۵ ± ۰/۲۸^{d}
نفوذ لوکوسیت	۰	۲/۷۵ ± ۰/۱۷^{b}	۲/۹ ± ۰/۹۹^{b}	۲/۷۵ ± ۰/۴۷^{b}	۱/۵۵ ± ۰/۴۱^{d}	۱/۷ ± ۰/۹۹^{d}
تحلیل سلول ها	.	۶/۳۰ ± ۱/۶۴^{c}	۳/۹۵ ± ۰/۲۵^{b}	۳/۱۵ ± ۰/۶۰^{b}	۱/۰۷ ± ۰/۵۰^{d}	۱/۰۰ ± ۰/۱۷^{d}
نکروزه شدن	۱/۵۵ ± ۰/۲۸	۳۲/۳۰ ± ۲/۴۷ ^{c}	۲۸/۸۰ ± ۳/.۹۳ ^{b}	۲۵/۵۵ ± ۱/۳۵^{b}	۱۰/۲۵ ± ۰/۸۹^{d}	۸/۵۵ ± ۰/۵۹^{d}

K0: کنترل منفی(موش سالم)

K1: کنترل مثبت(بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*))

K2:تیمار با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K3: تیمار با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K4 تیمار با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K5: تیمار با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

جدول ۲- اثر عصاره اتانولی دانه زیتون تلخ بر روی شاخص های بافتی کبد در موش های آلوده شده با تریپانوزوم اوانسی

عصاره اتانولی دانه زیتون تلخ	(K0)	(K1)	(K2)	(K3)	(K4)	(K5)
٪بازدارندگی رشد انگل	۰	۰	۲۵/۶۴	۲۸/۷۸	۶۵/۶۸	۸۸/۵
سلول های نرمال	۶۳/۶۵ ± ۹/۵۹^{b}	۲۷/۲۵ ± ۲/۳۲^{a}	۴۰/۱۵ ± ۴/۸۷^{c}	۴۸/۹ ± ۴/۲۶^{c}	۵۴/۲۵ ± ۲/۴۵^{b}	۵۹/۱۰ ± ۱/۳۶^{b}
میزان خونریزی	۰	۹/۳۰ ± ۰/۸۱^{bc}	۱۰/۶۰ ± ۳/۸۲^{b}	۹/۷۵ ± ۲/۳۶^{c}	۴/۳۰ ± ۰/۴۱^{b}	۷/۰۵ ± ۰/۱۰^{b}
هایپرمی	۰	۲/۳۵ ± ۰/۵۷^{c}	۱/۹۷ ± ۰/۵۵^{b}	۱/۸۵ ± ۰/۱۷^{bc}	۱/۲۵ ± ۰/۰۸^{b}	۱/۵۵ ± ۰/۲۸^{b}
نفوذ لوکوسیت	۰	۲/۷۵ ± ۰/۱۷^{c}	۱/۱۹ ± ۰/۱۹^{b}	۱/۷۵ ± ۰/۴۷^{b}	۱/۵۵ ± ۰/۴۱^{b}	۱/۷ ± ۰/۱۹^{b}
تحلیل سلول ها	.	۶/۳۰ ± ۰/۶۴^{b}	۵/۹۵ ± ۰/۲۵^{b}	۴/۱۵ ± ۰/۶۰^{c}	۰/۷ ± ۰/۰۱^{d}	۰/۵۴ ± ۰/۰۱^{d}
نکروزه شدن	۱/۵۵ ± ۰/۸۲	۳۲/۳۰ ± ۱۰/۴۷ ^{c}	۲۸/۸۰ ± ۱۲/.۹۳ ^{b}	۲۵/۵۵ ± ۱۰/۳۵^{b}	۹/۲۵ ± ۱۰/۸۹^{d}	۷/۵۵ ± ۳/۵۹^{d}

K0:کنترل مثبت(بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*))

K1:کنترل منفی(موش سالم)

K2:تیمار با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K3: تیمار با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K4 تیمار با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K5: تیمار با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

جدول ۳- اثر عصاره اتانولی دانه زیتون تلخ و چریش بر روی میانگین تعداد تریپانوزوم اوانسی کبد در موش های آلوده شده

گروه ها	عصاره دانه چریش	عصاره دانه زیتون تلخ
کنترل منفی	۰	۰
کنترل مثبت	۶۳/۶۴ ± ۶/۷۴۳^{a}	۵۹/۷۸ ± ۳/۹۴۷^{a}
تیمار با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن	۳۲/۵۲ ± ۹/۶۷ ^{b}	۳۰/۵۶ ± ۴/۹۱۸ ^{b}
تیمار با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن	۲۰/۴۸ ± ۳/۳۴۳ ^{c}	۱۹/۳۶ ± ۷/۶۸۸ ^{c}
تیمار با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن	۱۱/۳۲ ± ۰/۹۰۱^{d}	۷/۳ ± ۱/۴۸۸ ^{d}
تیمار با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن	۵/۱۲ ± ۰/۵۶ ^{e}	۲/۴۳ ± ۰/۲۳ ^{e}

جدول ٤- اثر عصاره اتانولی دانه چریش بر روی شاخص های بیوشیمیایی کبد و تغییران وزن موش های آلوده شده با تریپانوزوم اوانسی

غلظت عصاره اتانولی	(K0)	(K1)	(K2)	(K3)	(K4)	(K5)
تغییرات وزن(گرم)	۴۱ ± ۸/۴^{a}	-۹ ± ۳/۷ ^{b}	۶ ± ۵/۸^{c}	۷ ± ۲/۵^{c}	۲۴ ± ۵/۸ ^{d}	۲۶ ± ۴/۹ ^{d}
AST(U/L)	۶۰/۶ ± ۲/۹۸^{a}	۱۰۶/۲ ± ۲/۵۶^{a}	۹۴/۰۶ ± ۳/۴۴^{b}	۹۱/۱۶ ± ۴/۱۲^{b}	۶۹/۲ ± ۲/۴۸ ^{ac}	۶۱/۶۲ ± ۷/۲۱ ^{ac}
ALT(U/L)	۶۲/۸ ± ۳/۲۵^{a}	۱۰۰ ± ۴/۱^{b}	۹۸/۰۶ ± ۲/۸ ^{b}	۹۴/۷۴ ± ۵/۴ ^{b}	۶۵/۶ ± ۲/۸ ^{ac}	۶۳/۶ ± ۴/۷۴ ^{ac}
ALP(U/L)	۸۰/۴ ± ۲/۳^{a}	۸۹/۲ ± ۳/۱۲ ^{ab}	۸۶/۲ ± ۲/۷۱^{ab}	۸۵/۸۵ ± ۵/۲۹^{ab}	۸۲/۱ ± ۳/۱۲ ^{ab}	۸۰/۸۰ ± ۴/۵۳ ^{ab}
MDA(پروتئین)	۱۳/۳ ± ۴/۴^{a}	۲۴/۱ ± ۰/۲۲ ^{b}	۱۶/۶ ± ۰/۲۲ ^{a}	۱۴/۱۴ ± ۰/۴۶ ^{ab}	۱۳/۹ ± ۰/۲۱^{ad}	۱۳/۵ ± ۳/۶۵ ^{ad}
MDA(پلاسما)	۳/۵۱ ± ۰/۱۶ ^{a}	۷/۷۹ ± ۰/۱۵ ^{b}	۴/۸۷ ± ۰/۱۳^{c}	۴/۴ ± ۰/۲۷^{c}	۳/۹۷ ± ۰/۵۶ a	۳/۶ ± ۰/۷۸^{a}
GPX(پروتئین)	۵/۳ ± ۰/۲۵^{a}	۲/۹ ± ۰/۲۵^{b}	۳/۶ ± ۰/۳ ^{c}	۴/۱ ± ۰/۶ ^{c}	۴/۹ ± ۰/۹^{a}	۵/۰ ± ۰/۲۸^{a}
GPX(پلاسما)	۳/۴ ± ۰/۲۴^{a}	۱/۱ ± ۰/۱ ^{b}	۲/۲ ± ۰/۱^{c}	۲/۷ ± ۰/۸^{c}	۳/۸ ± ۰/۴۴^{a}	۳/۶ ± ۰/۵۱^{a}
SOD	۶/۱ ± ۰/۲۵^{a}	۲/۵ ± ۰/۳۲^{b}	۴/۶ ± ۰/۳^{c}	۴/۹ ± ۰/۶۵^{c}	۵/۴ ± ۰/۲۴a	۵/۹ ± ۰/۲۸^{a}

K0:کنترل مثبت(بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*))

K1:کنترل منفی(موش سالم)

K2:تیمار با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K3: تیمار با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K4 تیمار با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K5: تیمار با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

جدول ۵- اثر عصاره اتانولی دانه زیتون تلخ بر روی شاخص های بیوشیمیایی کبد و تغییران وزن موش های آلوده شده با تریپانوزوم اوانسی

غلظت عصاره	(K0)	(K1)	(K2)	(K3)	(K4)	(K5)
تغییرات وزن(گرم)	۴۱ ± ۸/۴[a]	-۹ ± ۳/۷[b]	۱۰ ± ۱/۸[c]	۱۶ ± ۲/۵[c]	۳۴ ± ۵/۸[d]	۳۶ ± ۴/۹[d]
AST(U/L)	۶۰/۶ ± ۲/۹۸[a]	۱۰۶/۲ ± ۲/۵۶[a]	۸۴/۰۶ ± ۳/۴۴[b]	۸۱/۱۶ ± ۴/۱۲[b]	۶۷/۲ ± ۲/۴۸[ac]	۶۰/۶۲ ± ۷/۲۱[ac]
ALT(U/L)	۶۲/۸ ± ۳/۲۵[a]	۱۰۰ ± ۴/۱[b]	۸۸/۰۶ ± ۲/۸[b]	۸۴/۷۴ ± ۵/۴[b]	۶۴/۶ ± ۲/۸[ac]	۶۲/۶ ± ۴/۷۴[ac]
ALP(U/L)	۸۰/۴ ± ۲/۳[a]	۸۹/۲ ± ۳/۱۲[ab]	۸۵/۲ ± ۲/۷۱[ab]	۸۴/۸۵ ± ۵/۲۹[ab]	۸۱/۱ ± ۳/۱۲[ab]	۷۹/۸۰ ± ۴/۵۳[ab]
MDA(پروتئین)	۱۳/۳ ± ۴/۴[a]	۲۴/۱ ± ۰/۲۲[b]	۱۶/۶ ± ۰/۲۲[a]	۱۵/۱۴ ± ۰/۴۶[ab]	۱۳/۸ ± ۰/۲۱[ad]	۱۳/۳ ± ۳/۶۵[ad]
MDA(پلاسما)	۳/۵۱ ± ۰/۱۶[a]	۷/۷۹ ± ۰/۱۵[b]	۴/۵۴ ± ۰/۱۳[c]	۴/۱ ± ۰/۲۷[c]	۳/۸۹ ± ۰/۵۶ a	۳/۵۲ ± ۰/۷۸[a]
GPX(پروتئین)	۵/۳ ± ۰/۲۵[a]	۲/۹ ± ۰/۲۵[b]	۳/۹ ± ۰/۳[c]	۴/۲ ± ۰/۶[c]	۵/۰ ± ۰/۹[a]	۵/۲ ± ۰/۲۸[a]
GPX(پلاسما)	۳/۴ ± ۰/۲۴[a]	۱/۱ ± ۰/۱[b]	۲/۴ ± ۰/۱[c]	۲/۹ ± ۰/۸[c]	۳/۱ ± ۰/۴۴[a]	۳/۶ ± ۰/۵۱[a]
SOD	۶/۱ ± ۰/۲۵[a]	۲/۵ ± ۰/۳۲[b]	۴/۹ ± ۰/۳[c]	۵/۱ ± ۰/۶۵[c]	۵/۵ ± ۰/۲۴a	۶/۰ ± ۰/۲۸[a]

K0:کنترل مثبت(بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*))

K1:کنترل منفی(موش سالم)

K2:تیمار با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K3: تیمار با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K4 تیمار با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

K5: تیمار با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر وزن بدن موش الوده شده با۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون انگل (معادل ۳×۱۰^{۷} *T. evansi*)

بحث ونتیجه گیری

یافته های پژوهش فوق مطابق یافته های Astuti و همکارانش (۲۰۱۲) نشان دادکه عفونت *T. evansi* باعث نکروزه شدن سلول¬های کبدی، انحطاط چربی، پیکنوز، و هایپرمی در موش می شود(۶). مطالعات دیگر بر روی بزهای آلوده به *T. evansi* نیز آسیب های مختلفی در کبد مانند نکروز سلول های کبدی را نشان دادند(۴۴، ۲۹). تخریب چربی دور خطی اطراف ورید مرکزی در موش های آلوده به *T. evansi* به دلیل اثرات مخرب شیوع بالای انگل بر روی بافت ها گزارش شده است(۲۹). تخریب در ساختار کبدی موجب مهاجرت سلول های التهابی فاگوسیت و حرکت ماکروفاژها در عروق خونی برای آسیب به بافت ها را افزایش داده باشد. سلول های التهابی و ماکروفاژها رادیکال های آزاد تولید می کنند که می تواند منجر به آسیب سلولی شود. در طول التهاب، تکثیر لوکوسیت ها یافته و باعث افزایش ماکروفاژها می شود(۱۲). مطالعات بر روی گاومیش نشان داد که عفونت

T. evansi نه تنها باعث احتقان داخل رحمی در رگ¬های خونی و خون ریزی خارج عضلانی در کبد می گردد بلکه باعث ضایعات غیر اختصاصی هم چون ادم، احتقان و هموسیدروز در ریه ها را موجب می‌شود(۵۳). تأثیر منفی *T.evansi* در حیوانات ، توانایی آن در تولید همولیزین، ترکیبات سمی است که ممکن است گلبول های قرمز را لیز کند(۳۰). درپژوهش Shehu و همکاران ، ۲۰۰۶ گلبول های قرمز، پلاکت ها و رتیکولوسیت ها از طریق گیرنده های سیالیک اسید به سطح سطوح تریپانوزوم می چسبند و منجر به آسیب به سلول های گلبول قرمز می گردد(۴۴). این امر به این دلیل است که در امتداد سطح غشاهای گلبول قرمز چندین ناحیه ناپیوستگی رخ می دهد و در آن جا به تریپانوزوم ها می-چسبند(۳۰). خون ریزی در کبد موش های صحرایی آلوده به *T. evansi* نیز توسط Bal و همکاران ۲۰۱۲گزارش شده است فرض بر این بوده که این بیماری به دلیل شیوع بالای *T. evansi* در بافت ایجاد و منجر به تغییر نفوذپذیری غشایی عروق خونی می باشد(۷). به گفته و همکاران (۲۰۱۲) یک وضعیت بالینی معروف به خون ریزی پاره شدن یا آسیب رساندن به رگ های خونی به دلیل نفوذپذیری زیاد دیواره سلولی ، تسهیل و نشت گلبول‌های قرمز رگ های خونی است(۵۵). گزارش شده است هنگامی که تریپانوزوم های تهاجم کننده به بافت مانند گروه *T. brucei* از طریق آسیب های مکانیکی به اندوتلیوم عروقی سطح بین بافتی به بافت ها نفوذ می کنند(۵). انحطاط چربی با نسبت بالایی از لیپید در سیتوپلاسم مشخص می شود که منجر به تغییر هسته سلول ها و بزرگ شدن سینوس و نکروز سلول می شود(۳۸). دوزهای بالای عصاره چریش با کاهش اثر سمیت موجب کاهش نکروز شدن سلول ها و تعداد سلول های تخریب شده می گردد(۴). تجویز عصاره های برگ چریش در موش آلوده به *T. evansi* با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موثر بوده اگر چه همه پارامترهای مشاهده شده بهتر از پارامترهای کنترل منفی بوده است(۲). افزایش تعداد سلول های طبیعی کبد حاصل از ترکیبات فعال زیستی است که قادر به از بین بردن یا حداقل جلوگیری از رشد *T. evansi* یا کاهش اثرات آسیب پذیر سموم تولید شده توسط انگل هستند. چوداری و همکاران(۲۰۱۴) استدلال کردند که تجزیه شیمیایی نشان می دهد که عصاره چریش حاوی گلیکوزیدها، تانن، فلاونوئیدها و ساپونین است که به عنوان محافظ کبد عمل می کند(۱۱). Sonyafitri(۲۰۰۶) افزود که آزادیراختین(C35H44O16) فعال ترین ترکیب در عصاره چریش است. این لیمونوئید(تریترپنوئید) از رشد و نمو *T. evansi* جلوگیری می کند(۵۰، ۳۷). علاوه بر آزادیراختین، عصاره حاوی آلکالوئید، ترپنوئید، کینولید و ترکیبات فنلی ممکن است به عنوان ضدپروتوزوآ عمل می نماید(۵۷، ۲۶). چوداری و همکاران(۲۰۱۴) ثابت کرده اند که متابولیسم ثانویه موجود در عصاره می تواند آسیب های ناشی از الکل را کاهش داده و ترمیم کند(۱۱). Kale و همکاران(۲۰۰۳))عصاره با داشتن مواد شیمیایی به عنوان عامل محافظ کبد عمل می کند(۲۳). علاوه بر آن در صورت استفاده عصاره در دوزهای بالا کمتر از LD50 با کاهش تجمع سم باعث کاهش آسیب کبد و اختلالات در نفوذپذیری غشا، هموستازی اسمزی ، اتصال آنزیم و کوفاکتور می شود که به نوبه خود باعث کاهش اختلال در کار و عملکرد سلولی می شود(۴۱، ۲۰). کاتسیال و همکاران(۲۰۰۸) افزود عصاره برگ چریش اگر در دوز بسیار بالا(حداکثر ۲۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به مدت ۴ هفته داده شود ، منجر به افزایش اثرات سمی در کبد می شود(۲۵). این موارد شامل نفوذ به سلول های التهابی، افزایش تعداد سلول های کوفر، آپوپتوز و نکروز کبدی و تنگ شدن عروق خونی است. کاهش معنی دار وزن موش های الوده شده نسبت به گروه های تیمار شده

با عصاره دانه چریش و زیتون تلخ منعکس کننده اثر مهاری این عصاره ها است(۳۴). افزایش معنی دار میزان آنزیم های کبدی و MDA در موش های آلوده نسبت به گروه های تیماری نشان دهنده اثرات محافظتی عصاره برکبد است(۱۰). مطابق با نتایج گزارش شده توسط Yanpallewar و همکاران (۲۰۰۳) افزایش در MDA به معنی افزایش پراکسیداسیون لیپید است و اثر پراکسیداتیو عصاره(Nwobodo،۲۰۱۷)، موجب حفظ غشای سلولی می گردد. افزایش اثرات مثبت در دوزهای بالاتر عصاره وابسته بودن اثرات به دوز را نشان می دهد(۵۷، ۳۵).

منابع

1.Al-Emran, A., MShahed, S., Ahmed, F., Saha, S.K., ChandraDas, S., ChandraBachar, S. (2011). Evaluation of brine shrimp lethality and antimicrobial activity of *Azadirachta indica* leaf extract on some drug resistance bacteria in Bangladesh. Pharmacognosy Journal, 20(3); 66-71 **.**

2.Al-Fawwaz, A. T., Al-Khaza'leh. Kh.A. (2016). Antibacterial and antifungal effect of some natural extracts and their potential use as photosensitizers. European Scientific Journal, 12(6); 147-157**.**

3. Alzohairy, M. A. (2016). The rapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-11**.**

4.Amalina, N. (2009). Acute toxicity test of Valerian (*Valetiana officinalis*) extract on the liver of Balb/C mice. Karya Scientific paper. Semarang: Medical Faculty of Diponegoro University, Semarang**.**

5.Anosa, V.O., Kaneko, J.J.(1983). Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*), light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis, American Journal of Veterinary Research, 44 (4); 645-651**.**

6.Astuti, W.N.U.Rr., Rismawati, D., Hidayati, S. and Suntoro, H.S. (2012). The use of mindi (*Melia azedarch* L.) as antiparasit *Trypanosoma evansi* and its effect on the structure of hepatic and renal tissues in mice. Jurnal Kemajuan Terkini Penelitian Klaster Sains-Teknologi, 291-309**.**

7.Bal, S.M., Singla, D.L., Kumar, H., Vasudev, A., Gupta, K., Juyal, D.P. (2012). Pathological studies on experimental Trypanosoma evansi infection in swiss albino mice. Journal Parasitic Disease, 36(2);260-264**.**

8.Bisht, D., Khatoon, S., Srivastava, Sh., Singh Rawat, A .K. (2011). Determination of ursolic acid a biomarker in different swertia species through high performance thin layer chromatographymansi gupta,. Chinese Medicine 2 (4);56-68**.**

9.Biswas, D., Choudhury, A., Misra, KK. (2001). Histopathology of Trypanosoma (*Trypanozoon evansi*) infection in bandicoot rat. I. Visceral organs. Exp Parasitol, 99; 148–159 **.**

10. Chattopadhyay, RR., Bandyopadhyay, M. (2005). Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on serum lipid profile changes in normal and streptozotocin induced diabetic rats. African J. Biomed. Res., 8(2); 101 – 104**.**

11. Choudhary, U., Augustine, B.B., Lahkar, M., Mathew, A. (2014). Hepatoprotective effect of *Azadirachta indica* (neem) in alcohol-induced liver damage. World Journal of Pharmaceutical Research, 3(4);1913-1925**.**

12. Contran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L. (1994). Robbin's Pathologic Basis of Disease, 5th ed. WB Saunders, Philadelphia**.**

13.Dávila, A. M., Silva., R. A. (2000). Animal trypanosomiasis in South America; current status, partnership and information technology. Ann. N. Y. Acad. Sci., 916;199-212 **.**

14. Dhar, R., Zhang, K., Talwar, G. P., Garg, S., Kumar, N. (1998). Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem(*Azadirachta indica*) fractions. J .Ethno Pharmacol., 61; 31–39

15. Drabu, S., Khatri, S., Babu, Sh. (2012). Neem: healer of all ailments. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 3(1);120-126 **.**

16. Francesconi, I., Wilson, W. D. Tanious, F. A,. Hall, J. E., Bender, B. C., Tidwell, R. R. (1999). 2,4-Diphenyl furan diamidines as novel anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia agents. J. Med. Chem., 42; 2260-2265 **.**

17. Gill, BS. (1991). Trypanosomes and trypanosomiasis of Indian livestock, 1st revised edition. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi**.**

18. Gillingwater, K., Kumar,A., Anbazhagan, M., Boykin, D.W., Tidwell, R. R., Brun, R. (2009).

In vivo investigations of selected diamidine compounds against *Trypanosoma evansi* using a mouse model. Antimicrob Agents Chemother, 53(12); 5074–5079.

19. Govindchari, T. R. (1992). Chemistry and biological investigation on *Azadirachta indica* (the neem tree). Curr. Sci., 63; 117–122.

20. Innih. S.O., Eze, I.G., Ekpruke, D.C., Baxter, D., Grillo, D. (2014). The effect of aqueous extract of neem (*Azadirachta indica*) leaves on liver functions of wistar rats. A Peer-review. Journal of Biomedical Science, 13(2);61-66.

21. Jacobson, M. (1995). In the neem tree: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes (ed. Schmutterer, H.)., 484–495.

22. Jones, I., Ley, S. V., Denholm, A. A., Lovell, H., Wood, A., Sinden, R. E. (1994). Sexual development of malaria parasites is inhibited in vitro by the neem extract azadirachtin, and its semi-synthetic analogues. FEMS Microbiol. Lett, 120; 267–273 .

23. Kale, B.P., Kothekar, M.A., Tayade, H.P., Jaju, J.B., Mateenuddin, M. (2003). Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. Indian Journal of Pharmacology, 35; 177-180.

24. Kanokmedhaku, S., Kanokmedhaku, K. , Prajuabsuk, Th., S. Panichajaku. (2005). Azadirachtin derivatives from seed kernels of azadirachta e xcelsa. Journal of Natural Products, 68(7); 1047-50.

25. Katsayal, U.A., Nadabo, A.Y., Isiorho, V.J. (2008). Effects of methanol extract of *Azadirachta indica* leaves on the histology of liver and kidney of wistar rats. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences, 7(1); 9-14.

26. Karira, P.G., Rukunga, A.W., Wannyonvi, A.W., Muregi, F.M., Gathirwa, J.W., Omar, S.A. (2004). Antiplasmodial activity and toxicity of extract of plants used in traditional malaria therapy in Mem and Kifili districts of Kenya. Journal Ethnopharmacology, 34; 160-168.

27. Kausik, B., Chattopadhyay, I., Banerjee, RK., Bandyopadhyay, U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Science., 82; 1336-1345.

28. Kraus, W. (1995). In the neem tree: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes (ed. Schmutterer, H). pp 35–88.

29. Lazuardi, M.(2008). Histological structure of kidney and liver of trypanosomiasis suffered from trypanosomiasis after berenil® treatment. Jurnal Media Peternakan, 31(1); 14-21.

30. Mbaya, A., Kumshe, H., Nwosu, O.C. (2012). The mechanisms of anaemia in trypanosomosis: A Review, Anemia, D. Silverberg (Ed.), ISBN: 978-953-51-0138-3, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/anemia/the-mechanisms-of-anaemia-in-trypanosomosis-a-review.

31. Misra, KK., Chaudhury, A. (1974). Multiplication of visceral forms in 'surra' trypanosomes. In: Proceedings of the third international congress on protozoology, vol 1. Elsevier Biomedical Press, Toronto, p 204

32. Misra, KK., Ghosh, M., Choudhury, A. (1976). Experimental transmission of *T. evansi* to chicken. Acta Protozool,. 15; 381–386.

33. Mandeep, B., Singla, L. D., Kumar, H., Vasudev, A., Gupta, K. (2016). Pathological studies on Singh experimental *Trypanosoma evansi* infection in Swiss albino mice. J Parasit Dis., 36(2); 260–264.

34. Ngurea,R.M, Ongerib, B., Karoria, S. M., Wachiraa, W., Maathaib, R. G., Kibugic, J. K.(2009). Anti-trypanosomal effects of *Azadiracta indica* (neem) extract on *Trypanosoma brucei* rhodesiense-infected mice. Eastern Journal of Medicine., 14; 2-9.

35. Nwobodo, EI. (2017). Evaluation of antilipid peroxidation and hypolipidemic potentials of *Azadirachta indica* leaf aqueous extract in paracetamol induced hepatotoxicity in wistar rats. Int. J. Inform. Res. Rev., 4(2); 3615-3619.

36. Nwobodo, E. I., Nwosu, D. C., Ogbodo, S. O., Ugwuene, F. O., Ihim, A. C., Ani, N.O. (2018). Effects of *Azadirachta indica* leaf aqeous extract on the antioxidant enzymes in paracetamol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. Int. J. Biol. Chem. Sci., 12(1); 1-10.

37.Nzelibe, C.H., Habila, N., Agbaji, S.A. (2013). Sinergy of *Azadirachta indica* seed and Tridax procumbens leaf extracts induced death of *Trypanosoma evansi*. International Journal of Traditional and Natural Medicines, 3(1);11-18.

38. Oktavianti, R., Harini, M., Handajani, S.N. (2005). Histological structure of rat (*Mus musculus* L.) liver after oral administration of aspartam. Enviro, 5; 30-31

39. Patel, NM., Avastthi, BL., Prajapati, KS., Kathiria, LG., Heranjal, DD. (1982). Histopathological lesions in experimental trypanosomiasis in rats and mice. Indian J Parasitol, 6; 107–109.

40. Rao, P.U. (1987). Chemical composition and biological evaluation of debitterized and defatted neem (*Azadirachta indica*) seed kernel cake. J. Am. Oil Chem. Soc., 64 (9); 1348-1351.

41. Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V. (2007). Cellular injure, adaptation, and death. In: Textbook of Patology, vol 1. EGC, Jakarta
42. Sackey, AK. (1998). Comparative study of trypanosomosis experimentally induced in Savanna Brown bucks by *Trypanosoma bruci*, T. congolense and *T. vivax*. Ph.D. thesis, Ahmado Bello University, Zaria**.**
43. Seidl, A. F., Moraes, A. S., Silva, R. A. (2001). *Trypanosoma evansi* control and horse mortality in the Brazilian Pantanal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 96; 599-602 **.**
44. Shehu, A.S., Ibrahim, D.G.N., Esievo, N.A.K., Mohammed, G. (2006). Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in savannah brow buck. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9(3); 522-525**.**
45. Siddiquia, B.Sh., Alia, Sy. K., Alia, Sy. T., Naeem, Sy., Naqvib, H., Tariq, R. M. (2009). Variation of major limonoids in *Azadirachta indica* fruits at different ripening stages and toxicity against Aedes aegypti. Natural Product Communications4 (4); 473 – 476**.**
46. Singla, LD., Juyal, PD., Ahuja, SP. (1995). Serum circulating immune complexes in *Trypanosoma evansi* infected and levamisole treated cow-calves. Indian J Anim Health, 34(1):69–71**.**
47. Singla, LD., Juyal, PD., Sandhu, BS. (2001). Clinico-pathological response in *Trypanosoma evansi* infected and immuno-suppressed buffalo-calves. In: 18th International conference of WAAVP, WAAVP, Stresa, 26–30**.**
48. Singla, N., Parshad, VR., Singla, LD. (2003). Potential of *Trypanosoma evansi* as a biocide of rodent pests. In: Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ, Spratt DM (eds) Rats, mice, and people: rodent biology and management. ACIAR, Canberra, pp 43–46**.**
49. Soeiro, M. N., De Souza, E. M., Stephens, C. E., Boykin, D. W. (2005). Aromatic diamidines as antiparasitic agents. Expert Opin. Investig. Drugs, 14; 957-972**.**
50. Sonyafitri, D. (2006). Investigation of insecticide ability of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves and mindi (*Melia azedarach* L.) leave extract on the development of storage insect pest *Sitophilus zeamais* Motsch. Thesis. Bogor Agricultural University, Bogor**.**
51. Uche, UE., Jones, TW. (1992). Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. J Comp Pathol., 106; 299–309**.**
52. Talwar, GP., Pal, R., Singh, O., Garg, S., Taluja, V., Upadhyay, SN. (1995). Safety of intrauterin administrering av renad neemfröolja (*Praneem vilci*) hos kvinnor och effekten av dess samtidig administrering med heterospecies dimer-preventivvaccin på antikroppssvar mot humant koriongonadotropin. Indiska J.Med.Res., 102; 66-70 **.**
53. Verdillo, J.C., Lazaro, J.V., Abes, N.S., Mingala, C.N. (2012). Comparative virulence of three *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes in the Philippines. Exp. Parasitol., 130(2);130-4**.**
54. Wardani, E. (2015). Activity test of Wedelia biflora leaf estract as anti trypanosoma in white rats (Rattus norvegicus). Jurnal Medika Veterinaria, 9(1); 1-3**.**
55. Widodo, S., Sajuthi, D., Choliq, C., Wijaya, A., Wulansari, R., Lelana, R.P.A. (2012). Clinical Diagnostic for Small Animal Clinic. IPB Press, Bogor **.**
56. Wilson, W. D., Nguyen, B., Tanious, F. A., Mathis, A., Hall, J. E., Stephens, C. E. (2005). Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity. Curr. Med. Chem. Anticancer Agents, 5; 389-408 **.**
57. Yanpallewar, SU., Sen, S., Kumar, M., Raju, SS., Achary, SB. (2003). Effect of *Azadirachta indica* on paracetamol induced hepatic damage in albino rat. Phytomedicine, 10; 391-396

The Effect of Hydro Ethanolic Seeds Extract of Neem(*Azadirachta indica*) and Bakain (*Melia azedarach*) to the Number of *Trypanosoma evansi* Steel in Liver of Mice

Sh. Nassiri Semnani[1], N. Ghassempoor[2]
1. Assistant Professor in Department of Microbiology, Factualty of Bacic Sciences -Engineering, Zanjan Branch, Islamic Azad university, zanjan.Iran.**sh.nasiri92@yahoo.com**
2.PhD. student General Veterianary, Factualty of Veterianary Razi University, Kermanshah. Iran.
ng.nastaranghassempoor2060@gmail.com.

Received:2021.12.1 **Accepted: 2021.20.5**

Abstract

Inroduction & Objective: ***Trypanosoma evansi*** **induced trypanosomiasis causes infection in domestic mammals as well as humans. Treatment of trypanosomiasis has limitations, including resistance to chemical drugs. The aim of this study was to identify active natural products and compare the effects of hydroalcoholic extracts of neem seeds and bitter olives against the resistant agent of this disease in the liver organ of mice infected with *Trypanosoma evansi.***

Material and Methods: After collecting and identifying neem and Bakain seeds plants, hydroalcoholic extract was prepared from their seeds by Perkoleh method and after concentrating 100-500 mg / kg of rat weight peritoneally to male rats infected with 3×10^7 *Trypanosoma evansi* were injected for 3 days. Routine method was used to determine the number of noises. Serum levels of ALT, AST, ALP were measured. Tissue pathology tests of. Histopathological liver tests were performed after hematoxylin and eosin staining. Statistical evaluation was performed using ANOVA analysis of variance and Prism software and the error limit of

$p < 0.05$ was accepted as a significant difference.

Results: Neem and Bakain seeds extracts both reduced the number of parasites and compared to the two extracts, the reducing effect of Bakain was greater than that of Neem. Congestion changes, fat degeneration, vacuolar degeneration, Necrosis and cell infiltration in the liver nephritis was higher of the control groups than the treated groups.

Conclusion: The use of neem and Bakain seeds hydroalcoholic extracts of in a certain amount of herbal medicine is effective in trypanosomosis (soda).

Keywords: liver, *Trypanosoma evansi* Steel, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica.*