تاثیر داروی MS14 بر سپسیس کاندیدیایی در موش Balb/C

مرضیه اقتداردوست[۱]، رویا یارائی[۲،*]، طوبی غضنفری[۲،۳]، محسن ناصری[۴،۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، کارشناس گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخهای ایمنی مرکز تحقیقات پزشکی دانشگاه شاهد، تهران
۲. PhD ایمنولوژی، دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران
۳. گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخهای ایمنی مرکز تحقیقات پزشکی دانشگاه شاهد، تهران
۴. PhD فارماکولوژی ،استادیار گروه طب سنتی ایران، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران
۵. مرکز تحقیقات گیاهان داروئی دانشگاه شاهد، تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران- بلوار کشاورز- خ برادران شهید عبدالله زاده- دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد- گروه ایمنولوژی، تلفن ۸۸۹۶۴۷۹۲ داخلی ۲۳۹، ryaraee@gmail.com

دریافت مقاله: مهر هشتاد و هفت پذیرش برای چاپ: دی هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *بیماریهای متعددی از اختلال در عملکرد صحیح دستگاه ایمنی ناشی می شود از این رو وجود داروهایی که بتوانند این پاسخهای نامطلوب را تعدیل کنند (ایمونومدولاتورها) بسیار مهم هستند. ولی برخی از مـوادی کـه بـه عنـوان ایمنومـدولاتور معرفـی میشوند ممکن است با سرکوب سیستم ایمنی، فرد را نسبت به ابتلا به عفونت ها مستعد نمایند. در این مطالعه اثر داروی MS14 کـه منشاء گیاهی-دریائی دارد و بعنوان ایمونومدولاتور معرفی شده است بر مقاومت در مقابل عفونت کاندیدیائی مورد بررسـی قـرار گرفتـه است.*

روش کار: *تعداد ۱۲ راس موش Balb/C ماده با سن ۶-۸ هفته به دو گروه تقسیم شدند. به هر موش تعداد ۵ میلیون مخمر کاندیدا البیکنس سوش PTCC5027 از راه ورید دمی تزریق گردید. پودر داروی MS14 در سرم فیزیولـوژی حـل و بـه ۶ مـوش گـروه دارو روزانه ۱۰۰ میکرولیتر (با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) خورانده شد . به ۶ موش گروه کنترل نیز به همین میـزان سـرم فیزیولـوژی خورانده شد. کاهش تحرک موشها و میزان مرگ ومیر در هر گروه ۲۴ ساعت بعد از تزریق کنترل گردید. بعد از شش روز موشهای باقی مانده بیهوش شدند کلیه آنها جدا و برای بررسی حضور کاندیدا کشـت داده شـد و همچنـین وضـعیت ماکروفاژهـای صـفاقی بررسـی گردید. از قلب موشها نیز خون گرفته شد و در محیط براث کشت داده شد. یافته ها با ازمون تی و مربع کـای تجزیـه و تحلیـل شـد و $P < ۰/۰۵$ معنی دار تلقی گردید.*

یافته ها: *داروی MS14 موجب کاهش میزان مرگ و میر بعد از ۲۴ ساعت ($P < ۰/۰۵$) و کاهش تعداد کلنی حاصل از کشت کلیه (میانگین تعداد کلنی در گروه کنترل ۴/۰۱ و در گروه دارو ۰/۸۴ ، $P < ۰/۰۳۱$) و تعداد کلنی حاصل از کشت خـون شـد. همچنـین تحرک موشها در گروه دارو نسبت به گروه کنترل افزایش داشت. تعداد ماکروفاژهای صفاقی در موشهای گروه دارو نیـز افـزایش معنـی داری را نشان داد. میانگین تعداد ماکروفاژهای صفاقی بـه ازای هـر مـوش در گـروه کنتـرل $۸/۲۵ \times ۱۰^{۶}$ و در گـروه دارو $۱۴/۳۷ \times ۱۰^{۶}$ مشاهده گردید ($P < ۰/۰۵$).*

نتیجه گیری: *با اینکه داروی MS14 به عنوان یک ایمنومدولاتور، که موجب کاهش برخی پاسخهای ایمونولوژیک (عمـدتا پاسـخهای التهابی) میگردد، پیشنهاد شده است ولی در برابر ارگانیسم فرصت طلبی چون کاندیدا آلبیکنس اثر حفاظت کنندگی دارد.*

واژگان کلیدی: *ایمنومدولاتور، MS14، کاندیدا البیکنس، مرگ و میر، سپسیس*

مقدمه

کاندیدیازیس منتشره یک بیماری تهدید کننده حیات با میزان مرگ ومیر بالاتر از ۴۰٪ است. کاندیدا البیکنس چهارمین ارگانیسم جدا شده از عفونتهای جریان خون در بیماران بستری در بیمارستان است(۱و۲). با وجود استفاده وسیع آنتی بیوتیکها و انالوگهای سنتزی آنها ، هنوز جستجو برای یافتن عوامل ضد الودگی جدید لازم است؛ زیرا برخی عوامل آنتی باکتریال مهم عوارض جانبی جدی و شدیدی دارند(۳). از طرفی با توجه به اینکه کاندیدا البیکنس یک میکروارگانیسم فرصت طلب است (۴)، داروهای ایمنومدولاتور می توانند احتمال ایجاد چنین عفونتهای فرصت طلبی را افزایش دهند(۵). فرآورده گیاهی- دریایی MS14 که بعنوان یک ایمونومدولاتور معرفی شده است، متشکل از ۹۰٪ شاه میگو (از خانواده سخت پوستان)، ۵٪کرفس وحشی و ۵٪ هوفاریقون یا علف چای می باشد(۶). MS14 برای درمان مبتلایان به مالتیپل اسکلروزیس معرفی شده است(۷) و مطالعات قبلی نشان میدهد که تا دوزهای بسیار زیاد فاقد اثرات سمی است(۸)، قدرت ضد التهابی دارد(۹) و در بهبود علائم موشهای مبتلا به انسفالومیلیت اتو ایمیون تجربی مفید است(۱۰). مطالعات نشان می دهد که گیاهان منابع فراوان ترکیبات آنتی میکروبی هستند و قرنها برای جلوگیری از رشد میکروبها استفاده می شوند (۱۱) و اثرات جانبی و مضر کمتری نیز نسبت به ترکیبات شیمیایی دارند. ولی از آنجا که داروهای ایمونومدولاتوری که باعث کاهش فعالیت سیستم ایمنی شده ممکن است احتمال ابتلا به عفونتها را افزایش دهند، بررسی این پدیده در مورد این فرآورده لازم است. مطالعه حیوانی کاندیدا البیکنس از بهترین مدلها برای این بررسی است (۱۲) و رایج ترین مدل حیوانی کاندیدیازیس منتشره، مدل تزریق یا آلوده سازی از مسیر رگ دمی موش است. بعد از تزریق مخمر به درون رگ دمی موش، کاندیدا البیکنس سیستم گردش خون را ترک می کند و قادر است به هر اندام پارانشیمالی هجوم ببرد. قارچها معمولا در کلیه تجمع می یابند(۱۳) و مرگ موشها معمولا به علت نقص کلیوی است اما قارچها در طحال، کبد، قلب، ریه ها و اعصاب مرکزی نیزمشاهده می شوند(۱۴). سندرم سپسیس یک پاسخ سیستمیک به عفونتهای باکتریایی و از جمله کاندیداست که پاسخهای ایمنولوژیک در آن نقش بسیار مهمی دارند. توسعه درمانهای ایمنومدولاتوری یکی از فرضیه های اصلی درمانهای جدید سپسیس است(۱۵) .در این مطالعه اثر فرآورده گیاهی- دریایی MS14 که بعنوان یک ایمونومدولاتور معرفی شده است، بر سپسیس کاندیدیایی در مدل موشی Balb/C بررسی شده است تا مشخص شود آیا این فرآورده عوارض جانبی مثل کاهش قدرت محافظت در مقابل عفونت دارد؟، بدون عوارض جانبی است؟ یا حتی می تواند دارای اثرات مفید در مقابله با این عفونت باشد؟

روش کار

۱۲ راس موش balb/c ماده با سن ۶-۸ هفته از حیوان خانه دانشکده پزشکی شاهد تهیه و وزن گردید و به دو گروه کنترل و دارو تقسیم شد. میانگین وزنی هر دو گروه حدود۲۸/۵ گرم وتعداد هر گروه ۶ راس بود.

مخمر کاندیدا البیکنس (سوش Persian type PTCC 5027 culture collection) ازمرکزپژوهشهای علمی صنعتی ایران تهیه گردید. به منظور افزایش بیماریزایی مخمرها، تعداد ۲×۱۰^{۶} مخمر را از راه ورید دمی به یک موش balb/c ماده تزریق و بعد از گذشت سه روز موش بیهوش و کلیه ان جدا و کشت داده شد. کلنی کاندیدا البیکنس حاصل از کشت کلیه برای ادامه آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای اثبات اینکه کلنی های حاصل کاندیدا البیکنس است دو تست تشخیصی، کشت بر روی محیط کروم اگار و تشکیل کلنی های سبز رنگ و انکوباسیون ۲ ساعته مقداری از کلنی در FBS (Gibco) (سرم جنین گاوی) و تشکیل جرم تیوب انجام گرفت(۱۶و۱۷). در ابتدا به هر موش در هر دو گروه از راه ورید دمی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی حاوی ۵×۱۰^{۶} مخمر تزریق شد. یک ساعت بعد از تزریق، متناسب با میانگین وزن موشها مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم پودر داروی MS14 در سرم فیزیولوژی حل شد و به وسیله فیدینگ تیوب به هر موش در گروه دارو مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر دارو؛ و به موشهای گروه کنترل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی خورانده شدموشها به مدت ۷ روز نگهداری شدند و در طی این مدت هر روز با توجه به گروه، سرم فیزیولوژی و دارو دریافت کردند. برخی از آنها مخصوصا در گروه کنترل در روز اول مردند و بقیه بعد از ۷ روز به وسیله دی اتیل اتر بیهوش و کشته شدند. مراحل زیر نیز برای تمام موشها انجام شد.

۱. جدا کردن ماکروفاژهای صفاقی به وسیله تزریق ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی سرد (در دو مرحله و هر بار ۵ میلی لیتر) جهت شمارش ماکروفاژهای صفاقی.
۲. خون گیری از قلب و کشت: مقدار ۶۰ میکرولیتر از خون هر موش برای کشت به ۳ میلی لیتر محیط سابورود دکستروز مایع (براث) (MERK) منتقل شد و لوله ها به مدت ۱۰ روز در ۳۷ درجه انکوبه و سپس با تهیه رقت سریال۱/۱۰ از محیط براث و کشت روی محیط سابورود دکستروز اگار جامد (MERK) و انکوبه کردن به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه و شمارش تعداد کلنی های حاصل، نتایج مورد بررسی قرار گرفت.
۳. بخشی از کلیه ها به وسیله پیستون و گذراندن از مش هموژن شدند (۱۸) و بعد از تهیه رقت سریال ۱/۱۰، روی محیط سابورود دکستروز اگار کشت داد شد و ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد وتعداد کلنیهای حاصل شمارش شدند.
۴. تمام موشها روزانه به مدت ۳۰ دقیقه تحت نظر قرار گرفتند و عدم حرکت به سمت منبع غذایی موجود در قفس در فواصل ۵ دقیقه به عنوان کاهش تحرک در نظر گرفته شد.

برای تهیه رقت سریال در شرایط استریل یک دهم ،۲۰ میکرولیتر از مایع مورد نظر (خون یا بافت هموژن شده کلیه) به ۱۸۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید وبرای رقت ۱/۱۰۰ ، از این محلول ۲۰ میکرولیتر به ۱۸۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد و برای رقت ۱/۱۰۰۰ ، ۲۰ میکرولیتر از این محلول به ۱۸۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد.

جهت مقایسه بین گروه کنترل و دارو در تستهای کشت کلیه و تعداد ماکروفاژهای صفاقی ، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون تی و برای بررسی تحرک و مرگ ومیر موشها از آزمون مربع کای استفاده شد. در هر دو تست P کمتر و برابر ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

میزان آلودگی موشها به وسیله دو پارامتر اصلی میزان مرگ و میر و کاهش تحرک بعد از آلودگی و شمارش تعداد کلنی های (CFU) حاصل از کشت بافت کلیه سنجیده شد پارامترهای مهم دیگری همچون تعداد ماکروفاژها صفاقی و کشت خون نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

روز اول بعد از آلودگی ۳ موش از گروه کنترل مردند و بقیه موشهای گروه کنترل و تمام موشهای گروه دارو شش روز بعد از آلودگی زنده بودند($P<۰/۰۴۶$).

در گروه کنترل موشهایی که روز اول بعد ازتزریق مردند دارای کشت مثبت بودند و در تمام رقتها کلنی مخمر رشد کرده بود . ولی بعد از شش روز مابقی موشهای گروه کنترل و موش های گروه دارو (بجز موش به شدت آلوده که البته با وجود آلودگی شدید، زنده مانده بود) در هیچ رقتی کلنی تشکیل نشده بود. روش دیگر بررسی الودگی کشت خون، مشاهده ماکروسکوپی لوله های حاوی کشت است که ایجاد رنگ زرد و وجود کدورت نشان دهنده الودگی به قارچها است(۱۹)، (تصویر۱).

برای سنجش مقدار کاندیدای موجود در خون : لگاریتم تعداد کلنی های تشکیل شده به مقدار خون (۶۰میکرولیتر) کشت داده شده تقسیم شد.

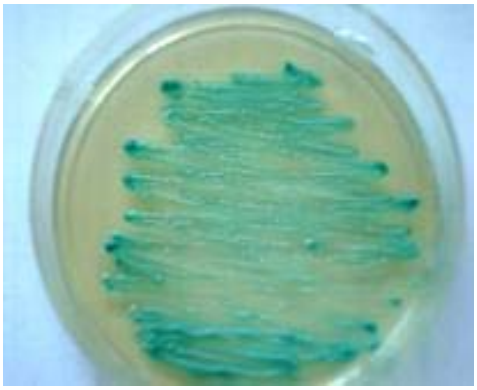
میانگین تعداد ماکروفاژهای صفاقی در گروه کنترل حدود ۸/۲±۳/۷ میلیون به ازای هر موش و در گروه دارو ۱۴/۴±۴/۴ میلیون به ازای هر موش بود ($P<۰/۰۴۹$).

تعداد کلنی های رشد یافته در گروه کنترل در تمام رقتها بیشتر از گروه دارو بود. لگاریتم تعداد کلنی در گروه کنترل ۳±۴ و در گروه دارو ۰/۲± ۰/۸۴ به دست آمد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار است($P<۰/۰۳$). بعبارت دیگر این فرآورده موجب کاهش تراکم میکروبی کلیه شده است (تصویر ۲).

برای سنجش مقدار کاندیدای موجود در کشت بافت کلیه از فرمول لگاریتم تعداد کلنی شمارش شده تقسیم بر وزن مقدار کلیه کشت داده شده استفاده شد(۱۹).

جهت بررسی کاهش تحرک ۱۹ راس موش Balb/c ماده انتخاب و به دو گروه کنترل (۱۰راس) و گروه دارو(۹ راس) تقسیم گردید. تعداد ۱۱میلیون مخمر کاندیدا طی ۲۴ ساعت به موشهای هر دو گروه از راه ورید دمی تزریق شد. بقیه مراحل مانند مرتبه اول انجام شد. ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق، ۲موش از گروه کنترل در هر مرحله مردند. در گروه دارو ۲ موش ۴۸ ساعت بعد از تزریق از بین رفت.

موشهای زنده هر روز از نظر کاهش تحرک بررسی شدند. در ۸ موش از گروه کنترل ۲۴ ساعت بعد از تزریق کاهش تحرک دیده شد که تا ۴۸ ساعت بعد نیز ادامه یافت. در گروه دارو ۹ موش ۲۴ ساعت بعد از تزریق دچار کاهش تحرک شدند. این تعداد در ۴۸ ساعت بعد به ۷ موش رسید که تا ۷۲ ساعت بهد از تزریق ادامه یافت($P<۰/۰۰۲۱$).



تصویر ۱- کشت کلنی کاندیدا البیکنس درمحیط کروم اگار

تصویر۲- مقایسه کشت کلیه موش آلوده با کاندیدا البیکنس در دو گروه کنترل و دارو

بحث

در این مطالعه اثر فرآورده گیاهی- دریایی MS14 در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر سپسیس کاندیدیایی در موش Balb/c بررسی گردید و مشاهده شد این دارو در این دوز باعث کاهش ۸۰٪ کلنی های حاصل از کشت کلیه و همچنین سبب کاهش مرگ ومیر و کلنی های حاصل از کشت خون و موجب افزایش تحرک و تعداد ماکروفاژهای صفاقی به میزان ۷۴٪ می شود. جهت بررسی تاثیر دارو بر عفونت در شرایط آزمایشگاهی تست های مختلفی وجود دارد؛ که متداول ترین انها جهت سپسیس کاندیدایی انجام کشت کلیه و خون و بررسی میزان مرگ ومیر و کاهش تحرک موشها و مقایسه نتایج این تستها در دو گروه کنترل و دریافت کننده دارو است. در مطالعه Yera و همکارانش ذکر شده است که جدا کردن قارچ از کشت خون برای تایید بیماری کافی است و از این روش می توان جهت ارزیابی روند درمانی استفاده نمود البته در این مقاله پیشنهاد شده است که چون کشت خون یک روش حساس نیست و احتمال آلودگی با سایر میکروارگانیسمها وجود دارد بهتر است در کنار کشت خون از روشهای سرولوژیک با استفاده از انتی بادی ضد کاندیدا البیکنس نیز استفاده شود(۲۱). مطالعات نشان میدهد که به غیر از خون اندامهایی چون کلیه و کبد نیز جهت بررسی آلودگی به کاندیدا البیکنس مفیدند(۱۸). در مطالعه ای Timothyو همکارانش قارچ کاندیدا را به وسیله بیولومینانس نشان دار کردند و با روش تصویر برداری IVIS 100 TM نشان دادند که قارچها در کلیه لوکالیزه می شوند(۱۲). بنابراین بعد از ایجاد مدل سپسیس در موشهای ازمایشگاهی برای اثبات ایجاد مدل و همچنین برای بررسی اثر دارو ها بر سپسیس در شرایط invivo می توان از کشت کلیه و خون موشها به عنوان دو تست مهم در بررسی آلودگی به کاندیدا البیکنس استفاده نمود.

در مطالعه Akagawa و همکاران نشان داده شده است که برخی گیاهان دارویی ژاپنی مانند Juzen-taiho-to (TJ-48) و عصاره چند گیاه مشابه دیگر از طریق افزایش دادن فعالیت ضد کاندیدایی ماکروفاژها بر عفونتهای سیستمیک کاندیدایی اثر حفاظتی دارند و باعث افزایش بقاء موشهای آلوده نیز می شوند(۲۲). در مطالعه دیگری که توسط Abe و همکارانش صورت گرفته است اثر هفت داروی سنتی را بر عفونت کاندیدایی بررسی کرده اند و نتایج انها نشان می دهد که این داروها باعث افزایش طول عمر موشهای ایمنوساپرس آلوده به کاندیدا شده است و به عنوان یک روش درمانی در برابر عفونت سیستمیک کاندیدا در دست بررسی است(۲۳).

Thamburan و همکارانش نشان داده اند که سیر خوراکی و دو گونه مختلف سیر از افریقای شمالی اثر ضد کاندیدایی دارند و فونژیسیدال هستند(۲۴) و van den Bout و همکارانش اثر ۱۲ عصاره گیاهان تانزانیایی را بر عفونت کاندیدایی بررسی کرده اند و نشان داده اند که این گیاهان ممکن است کاندید خوبی برای درمان جدید عفونتهای فرصت طلب باشند، زیرا انها می توانند توکسیک و ژنوتوکسیک باشند و وقتی با عوامل ضد رتروویروسی استفاده می شوند باعث فعل و انفعالات فارماکوکینتیک می شوند (۲۵). با توجه به مطالعات صورت گرفته می توان گفت که برخی ترکیبات گیاهی که معمولا سالها پیش در طب سنتی کشورهای مختلف برای درمان عفونتها مورد استفاده قرار می گرفته است، دارای اثرات ضد قارچی و باکتریایی بر انواع عفونتها هستند و این فرضیه با مطالعات آزمایشگاهی قابل اثبات است.

با توجه به اینکه در مطالعه ما، معیارهای مشخص شده برای بررسی عفونت کاندیدیائی در گرووه دارو نه تنها افزایش پیدا نکرده بلکه با کاهش علائم شدید بیماری نیز مواجه هستیم می توان نتیجه گرفت که داروی MS14 نه تنها موجب کاهش ایمنی موشها در برابر این عفونت نشده است بلکه توانسته است در برابر آن اثر محافظت کننده ای داشته باشد. یعنی هم کاهش مرگ و میر اولیه؛ هم کاهش تعداد کلنی در کشت کلیه و خون و هم افزایش تحرک در گروه دارو مشاهده میشود. از آنجا که تعداد ماکروفاژهای صفاقی در گروه مصرف کننده دارو بالاتر بود، احتمالا افزایش دادن سلولهای ایمنی فاگوسیت کننده یکی از مکانیسمهای اثر مثبت دارو در روند بیماری است که میتوانند سبب کاهش کاندیداها از خون و کلیه شوند و بدین ترتیب باعث افزایش طول عمر موشها در گروه دریافت کننده دارو می شود. لازم به ذکر است که همین دارو در موشهای غیر آلوده نه تنها باعث افزایش ماکروفاژهای صفاقی نشده بلکه اثر کاهنده نیز دارد (مطالعات در دست چاپ). این فرآورده ممکن است در کنار افزایش تعداد ماکروفاژها ، تولید مواد التهابی مثل فاکتور نکروز توموری (TNF) را نیز کمتر کند و بخشی از مرگ و میر ناشی از سپسیس را که مرتبط با مقادیر بالای TNF است مهار نماید که البته نیاز به بررسی بیشتر دارد.

نتیجه گیری

MS14 بعنوان فرآورده ایمونومدولاتور نه تنها موجب افزایش مرگ و میر در اثر عفونت کاندیدائی نشده بلکه باعث بهبود شرایط نیز میگردد. بررسی بیشتر در مورد مکانیسمهای پیشنهاد شده و نیز بررسی اثر دارو در مدلهای عفونی دیگر میتواند میزان صلاحیت این فرآورده را به عنوان داروی موثر در شوک عفونی مشخص تماید.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر امرالله احمدی به جهت همکاری در این پژوهش از جمله کمک در تهیه فرآورده MS14 و همچنین ازکارشناس محترم آقای حسین نامی جهت همکاری در بخش میکروبیولوژی تشکر می‌شود.

REFERENCES

1.Pfaller M, Jones R, Messer S, Edmond M, Wenzel R. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998 May;31(1):327-32.

2. Wey B, Mori M, Pfaller M, Woolson R, Wenzel R.. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. Arch. Intern. Med1988. 148:2642-2645.

3. Olila D, Odyek O, Opuda-Asibo J. Antibacterial and antifungal activities of extracts of Zanthoxylum chalybeum and Warburgia ugandensis, Ugandan medicinal plants. Afr Health Sci. 2001 December; 1(2): 66–72.

4. Niewerth M, Korting HC. Candida albicans and the principle of opportunism. an essay. Mycoses. 2002 Oct;45(8):253-8.

5. Nauta EH, van Furth R. Infection in immunodepressed patients. The approach to diagnosis and treatment. Infection. 1975;3(4):202-8.

۶. پروانه تفرشی آزیتا، ناصری محسن، احمدی امرالله.بررسی اثر MS14 بر علائم بالینی و هیستو پاتولوژیک مدل حیوانیMS (EAE). طرح تحقیقاتی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴.

۷. . حاج هاشمی ولی الله، قفقازی تقی، احمدی امراله، بررسی سمیت تحت حاد داروی طبیعی در موش صحرایی.دانشور.۱۳۸۳؛ ۵۳(۱۱): ۱۲-۴

۸. ناصری محسن. احمدی امراله، قره گزلی کوروش، نبوی سید مسعود، فقیه زاده سقراط، اشتریان نویدو همکاران. بررسی سم شناسی بالینی فرآورده طبیعی MS14در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس، ، دانشور۱۳۸۶; سال۱۴، شماره۶۸: صفحات ۶۴-۵۹.

۹. . ناصری محسن. بررسی فرآورده طبیعی MS14برالتهاب ناشی از تزریق کف پایی فرمالین در موش صحرایی نر.گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، تهران، گروه پژوهشی طب سنتی ایران، دانشگاه شاهد، ۱۳۸۷.

10. Tafreshi A.P, Ahmadi A, Ghaffarpur M, Mostsfavi H, Rezaeizadeh H, Minaie B,et al. An Iranian herbal-marine medicine,MS14,ameliorates experimental allergic encephalomyelitis. Phytotherapy Research 2008: 1-14.

11. Zhang J, Cao Y, Xu Z, Sun H. In Vitro and in Vivo Antifungal Activities of the Eight Steroid Saponins from Tribulus terrestris L. with Potent Activity against Fluconazole-Resistant Fungal. Biol. Pharm. Bull. 2005. 28(12) 2211—2215

12. Doyle T, Nawotka K, Kawahara C. Visualizing fungal infections in living mice using bioluminescent pathogenic Candida albicans strains transformed with the firefly luciferase gene. Microbial Pathogenesis 2006 (40) 82–90.

13- Evans ZA, Mardon DN. Organ localization in mice challenged with a typical Candida albicans strain and a pseudohyphal variant. Proc Soc Exp Biol Med 1977;155:234–8.

14. Clayton B, Xiaomin Z, Lois L.Use of Green Fluorescent Protein and Reverse Transcription-PCR To Monitor Candida albicans Agglutinin-Like Sequence Gene Expression in a Murine Model of Disseminated Candidiasis. Infection and Immunity, 2005 March, 73(3).1852-55.

15. Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D. Anti-IL-10 Therapeutic Strategy Using the Immunomodulator AS101 in Protecting Mice from Sepsis-Induced Death: Dependence on Timing of Immunomodulating Intervention . The Journal of Immunology, 2002, 169: 384-392

۱۶. شادزی شهلا.قارچ شناسی پزشکی و روشهای تشخیص آزمایشگاهی، اصفهان، انتشارات جهاد دانشگاهی، ۱۳۷۹، صفحه ۵۳.

17. Ismail H. Sahand, Marı´a D. Moragues, Elena Eraso, Marı´a Villar-Vidal, Guillermo Quindo´s, and Jose´ Ponto´n. Supplementation of CHROMagar Candida Medium with Pal's Medium for Rapid Identification of Candida dubliniensis. Journal of clinical microbiology, Nov. 2005, p. 5768–5770.

۱۸. هلاکوئی مرضیه ، یادگاری محمد حسین، صراف زهیر حسن، مهدوی مهدی، اسکندری آزاده. بررسی اثر عفونت های قارچی (کاندیدیازیس)بر بقا وحجم تومور و نسبت سلولهای (CD4/CD8) T ارتشاح یافته به تومور در موشهای مبتلا به سرطان سینه. مجله پزشکی کوثر .شماره ۱، ۴۰-۱۳۸۶،۲۹

19. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin AC, Carricajo A, Acquart S, Maugery J, Aubert G. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. Br J Ophthalmol. 2001 Oct;85(10):1158-62.

20 Joly V, Yeni P. Rodent models of Candida sepsis. In: Zak O, Sande MA, editors. Handbook of animal models of infection. London: Academic Press; 1999. P 649–55.

21. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001 Dec;20(12):864-70.

22. Akagawa G, Abe S, Tansho S, Uchida K, Yamaguchi H. Protection of C3H/HE J mice from development of Candida albicans infection by oral administration of Juzen-taiho-to and its component, Ginseng radix: possible roles of macrophages in the host defense mechanisms. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1996 Feb;18(1):73-89.

23. Abe S, Ishibashi H, Tansho S, Hanazawa R, Komatsu Y, Yamaguchi H. Protective effect of oral administration of several traditional Kampo-medicines on lethal Candida infection in immunosuppressed mice. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2000;41(2):115-9.

24. Thamburan S, Klaasen J, Mabusela WT, Cannon JF, Folk W, Johnson Q. Tulbaghia alliacea phytotherapy: a potential anti-infective remedy for candidiasis. Phytother Res. 2006 Oct;20(10):844-50.

25. van den Bout-van den Beukel CJ, Hamza OJ, Moshi MJ, Matee MI, Mikx F, Burger DM, Koopmans PP, Verweij PE, Schoonen WG, van der Ven AJ. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and CYP450 enzymatic competition effects of Tanzanian plant extracts traditionally used for treatment of fungal infections. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008 Jun;102(6):515-26.