مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۲۵/هفته سوم فروردین ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۰

بررسی میزان اثربخشی مادهی S-allyl-cysteine بر بقا، آپوپتوز و پرولیفراسیون پروماستیگوت‌های انگل Leishmania major در شرایط برون‌تنی

دکتر گیلدا اسلامی[۱]، دکتر علی شمس[۲]، مهران فصاحت[۳]، حسن عشوری[۴]، زهرا هاتفی[۴]، یاسمین نبی‌پور[۴]، فرزانه میرزائی[۵]، دکتر سید حسین حجازی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تحقیقات بی‌شماری در راستای عصاره‌های روغنی سیر علیه انگل Leishmania انجام شده است، ولی مطالعات اخیر ثابت کرده است که این عصاره‌ها از جمله آلیسین خود سایتوتوکسیک هستند و خاصیت درمانی سیر مربوط به مادهای بی‌بو به نام SAC (S-allyl-cysteine) می‌باشد. از آن جایی که مطالعات کمی بر اثربخشی این ماده بر انگل Leishmania انجام شده است، در این مطالعه، میزان اثربخشی SAC بر بقا، آپوپتوز و پرولیفراسیون انگل Leishmania major در شرایط برون‌تنی بررسی شد.

روش‌ها: در این مطالعه از سویهی استاندارد Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) استفاده شد. پس از کشت، پروماستیگوت‌ها با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار از SAC مواجه شدند. پس از ۷۲ ساعت، تعداد انگل‌ها، آپوپتوز و پرولیفراسیون آن‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: هیچ کدام از غلظت‌های SAC باعث القای آپوپتوز در انگل نشد. بررسی پرولیفراسیون مشخص کرد که غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار دارای بیشترین اثر بر میزان تکثیر بودند. از طرف دیگر، مشاهدهی مستقیم مشخص کرد که محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های نهایی ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار دارای تعداد بیشتری اشکال روزت (Roset) می‌باشند.

نتیجه‌گیری: از آن جایی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی SAC ثابت شده است و این مطالعه نیز ثابت کرد که غلظت‌هایی از SAC می‌تواند اثر مناسبی بر بقا و افزایش رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت داشته باشد، به نظر می‌رسد که این ماده به عنوان عاملی محرک جهت رشد پروماستیگوت‌های انگل می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لیشمانیا ماژور، S آلیل- سیستیین، آپوپتوز، پرولیفراسیون

ارجاع: اسلامی گیلدا، شمس علی، فصاحت مهران، عشوری حسن، هاتفی زهرا، نبی‌پور یاسمین، میرزائی فرزانه، حجازی سید حسین. **بررسی میزان اثربخشی مادهی S-allyl-cysteine بر بقا، آپوپتوز و پرولیفراسیون پروماستیگوت‌های انگل Leishmania major در شرایط برون‌تنی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۲۵): ۱۳۰-۱۲۱

۱- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکدهی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۳- کارشناس، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکدهی پیرا پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی، گروه علوم آزمایشگاهی، کمیتهی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکدهی پیرا پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۶- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسندهی مسؤول: دکتر سید حسین حجازی
Email: hejazi@med.mui.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز مجموعه‌ای از بیماری‌های تک یاخته‌ای قابل انتقال بین انسان و حیوان است که در بیش از ۸۰ کشور جهان شایع می‌باشد (۲-۱). این بیماری به طور عمده شامل لیشمانیوز جلدی (سالک)، لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) و لیشمانیوز جلدی-مخاطی است و توسط گونه‌های متعدد تک یاخته‌ای از جنس Leishmania ایجاد می‌شود (۳). لیشمانیوز جلدی در ایران شیوع فراوانی دارد و میزان بروز سالیانه‌ی آن در سال‌های اخیر به دلیل افزایش جمعیت و عوامل شناخته و ناشناخته‌ی بسیار رو به افزایش بوده است (۴). بر اساس مقالات منتشر شده، میزان بروز لیشمانیوز جلدی در ایران ۳۰-۲۰ هزار مورد در سال است که به این ترتیب سالیانه ۲۰۰۰۰ مورد جدید در نقاط مختلف ایران دیده می‌شود (۵). عوارض و زیان‌های اجتماعی- اقتصادی قابل توجه این بیماری، آن را جزء یکی از مهم‌ترین بیماری‌های جهان قرار داده است؛ به صورتی که سازمان جهانی بهداشت لیشمانیوز را به عنوان یک مشکل بهداشتی در سطح جهان معرفی کرده است (۶).

درمان‌های متعددی برای لیشمانیوز جلدی پیشنهاد شده است، ولی هنوز درمان قاطعی وجود ندارد. در حال حاضر، مشتقات پنج ظرفیتی آنتی‌موآن (استیبو گلوکونات سدیم یا پنتوستام و مگلومین آنتی‌مونیات یا گلوکانتیم) خط اول درمان این بیماری هستند (۸-۷). این رژیم درمانی مشکلات متعددی در پی دارد. نحوه‌ی تهاجمی تجویز دارو (تزریق)، هزینه‌ی بالا، سمیت شدید، طولانی بودن زمان درمان، مقاومت دارویی و عوارض متعدد قلبی، کلیوی و کبدی از جمله عوارض این رژیم درمانی است. به علاوه، این رژیم درمانی در زنان باردار و مبتلایان به بیماری‌های قلبی و کلیوی منع مصرف دارد و مهم‌تر از همه این که اثربخشی آن کامل نیست و به طور معمول به چندین دوره‌ی درمان نیاز دارد (۹-۸، ۶). بنا بر علل فوق تلاش برای دستیابی به اشکال دارویی جدید که بتواند ضمن بهبود سریع‌تر زخم، کمترین عوارض جانبی را داشته باشد همچنان ادامه دارد.

امروزه از مهم‌ترین راهکارهای جدید در درمان بیماری‌ها از جمله لیشمانیوز جلدی، تحقیق بر روی محصولات طبیعی گیاهی است. سیر یکی از داروهای گیاهی می‌باشد که از گذشته‌های دور کاربرد وسیعی در درمان بسیاری از بیماری‌ها داشته است. تاکنون بیش از ۸۰۰۰ مطالعه‌ی علمی بر جنبه‌های مختلف شیمیایی، فارماکولوژی، بالینی و اپیدمیولوژیکی سیر انجام شده است. مطالعات فارماکولوژی و بالینی بر روی سیر در زمینه‌ی اثرات ضد میکروبی اعم از باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها، اثرات ضد سرطان، کاهش میزان قند خون، تحریک سیستم ایمنی، اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی انجام شده است (۱۴-۱۰).

سیر حاوی اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و انواع مواد معدنی است. عصاره‌های متنوعی از سیر وجود دارد، ولی مطالعات اخیر ثابت کرده است که با وجود باور قدیمی که آلیسین یک ماده‌ی مؤثر در سیر می‌باشد، تنها عصاره‌ی محلول در آب آن که حاوی SAC (S-allyl-cysteine) است و در اثر نگهداری طولانی مدت سیر در آب و الکل به دست می‌آید، دارای خاصیت درمانی می‌باشد. این ماده به صورت بدون بو است و دارای خاصیت محافظت آنتی‌اکسیدانی رادیکال‌های آزاد، سرطان و بیماری‌های قلبی- عروقی

می‌باشد (۱۵).

از آن جایی که مطالعات کمی بر روی تأثیر این ماده بر عامل لیشمانیوز جلدی صورت گرفته است، پژوهش حاضر به بررسی اثر SAC بر پرولیفراسیون و آپوپتوز پروماستیگوت‌های انگل L. major (MRHO/IR/75/ER) در شرایط برون‌تنی انجام شد.

روش‌ها

ماده‌ی SAC به صورت تخلیص شده به مقیاس ۱۰ میلی‌گرم و به صورت لیوفیلیزه از شرکت Sigma خریداری گردید و محلول ۲۰ میکروگرم در هر میکرولیتر آن توسط آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد.

برای انجام این مطالعه از سویه‌ی استاندارد Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) که از گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شده بود، استفاده گردید. پروماستیگوت‌ها درون محیط NNN (Nicole Navy Neal) اصلاح شده منتقل شدند و به حد کفایت رشد کردند. پس از آن به محیط RPMI ۱۶۴۰ منتقل شدند. سپس غلظتی از انگل به میزان ۶ میلیون پروماستیگوت فاز لگاریتمی در هر میلی‌لیتر تهیه شد.

پروماستیگوت‌های فاز لگاریتمی تهیه شده به میزان ۶ میلیون انگل در هر میکرولیتر، بر اساس جدول ۱ گروه‌بندی شدند و تحت مواجهه با SAC قرار گرفتند.

لازم به ذکر است که هر گروه حاوی ۱۵ لوله‌ی محیط کشت و هر محیط کشت دارای ۶ میلیون پروماستیگوت به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت بود. هر یک از گروه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط مساعد (دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری شد و پس از ۷۲ ساعت، آپوپتوز و پرولیفراسیون آن‌ها بررسی گردید.

پس از مواجهه، شمارش پروماستیگوت‌ها توسط لام نئوبار و زیر میکروسکوپ نوری انجام شد.

آپوپتوز توسط کیت Apoptotic DNA ladder (11835246001; Roche) و مطابق با دستورالعمل آن بررسی شد.

جهت بررسی پرولیفراسیون از کیت Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) (11647229001; Roche) و مطابق با دستورالعمل آن استفاده شد.

برای تعیین میزان اثربخشی ماده‌ی SAC بر پرولیفراسیون و آپوپتوز پروماستیگوت‌ها از آزمون‌های آماری One way ANOVA، Mann-Whitney و Kruskal-Wallis استفاده شد.

جدول ۱. گروه‌های مواجهه شده با مقادیر متفاوت از S-allyl-cysteine (SAC)

شماره‌ی گروه	محیط کشت RPMI 1640	غلظت نهایی SAC (میکروگرم)	غلظت نهایی SAC (میلی‌مولار)
گروه اول (شاهد)	بدون انگل	–	–
گروه دوم (شاهد)	حاوی انگل	بدون مواجهه	–
گروه سوم	حاوی انگل	۵۰ میکروگرم	۲/۵ میلی‌مولار
گروه چهارم	حاوی انگل	۱۰۰ میکروگرم	۵ میلی‌مولار
گروه پنجم	حاوی انگل	۲۰۰ میکروگرم	۱۰ میلی‌مولار
گروه ششم	حاوی انگل	۴۰۰ میکروگرم	۲۰ میلی‌مولار
گروه هفتم	حاوی انگل	۸۰۰ میکروگرم	۴۰ میلی‌مولار
گروه هشتم	حاوی انگل	۱۰۰۰ میکروگرم	۵۰ میلی‌مولار

SAC: S-allyl-cysteine

یافته‌ها

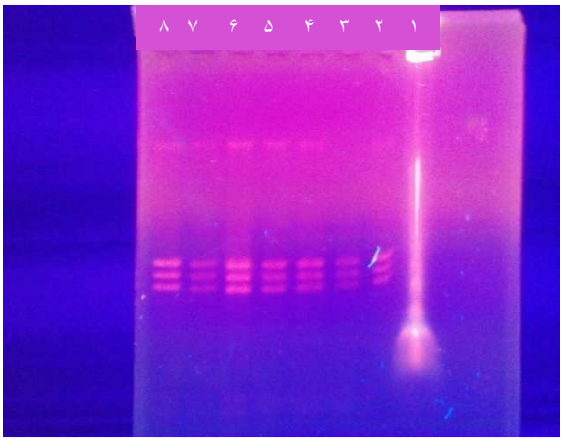
نتایج حاصل از میانگین شمارش پروماستیگوت‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

شکل ۱. میانگین تعداد انگل در محیط‌های کشت mM: معرف واحد میلی‌مولار و بیانگر غلظت نهایی S-allyl-cysteine (SAC) در محیط‌های کشت است.

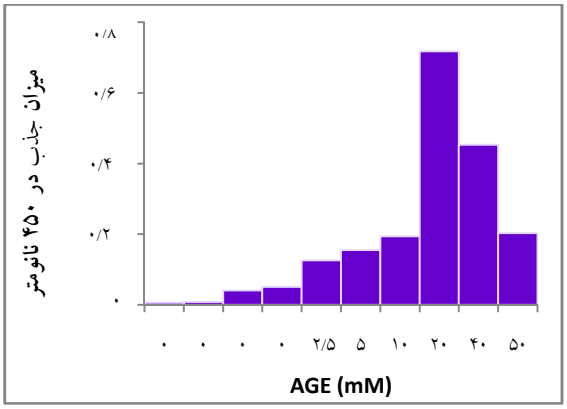
در مشاهده مستقیم مشخص شد که لوله‌های محیط کشت دارای انگل پروماستیگوت که دارای مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار از ماده‌ی SAC بودند، دارای اشکال Roset بسیار زیادی بودند. این مسأله در حالی بود که در سایر لوله‌های کشت تعداد این Rosetها بسیار کم بود.

بررسی آپوپتوز توسط کیت Apoptotic DNA ladder kit (11835246001) انجام شد. با بررسی الکتروفورز در کنار شاهد مثبت مشخص شد که هیچ کدام از گروه‌ها، آپوپتوز را نشان ندادند (شکل ۲).

بررسی پرولیفراسیون توسط کیت Cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric) انجام شد. داده‌های مربوط به میزان جذب در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲. تصویر ژل آگارز نشان‌دهنده‌ی نتایج بررسی آپوپتوز از سمت راست به ترتیب: جایگاه ۱ مربوط به شاهد مثبت و جایگاه ۲ تا ۸ مربوط به نمونه‌هایی از گروه‌های مواجهه‌شده با S-allyl-cysteine (SAC) به ترتیب در غلظت‌های نهایی ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار هستند. در مقایسه با شاهد مثبت، هیچ آپوپتوزی در گروه‌های مواجهه‌شده دیده نشد.



شکل ۳. میانگین میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر به ترتیب از سمت راست: شاهد ۱ مربوط به ویال‌های دارای Anti-BrdU-POD و فاقد SAC، شاهد ۲ مربوط به ویال‌های دارای BrdU و فاقد S-allyl-cysteine (SAC)، شاهد ۳ مربوط به ویال‌های دارای محیط کشت بدون سلول و فاقد SAC و شاهد ۴ مربوط به ویال‌های دارای سلول‌های پروماستیگوت Leishmania به میزان ۱۰۶ در هر میلی‌لیتر و فاقد SAC است. mM: معرف واحد میلی‌مولار و بیانگر غلظت نهایی SAC در محیط‌های کشت است.

بررسی تعداد انگل‌های موجود در محیط کشت‌ها

پس از ۷۲ ساعت نشان داد که SAC دارای غلظت‌های نهایی ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار دارای اثر معنی‌داری بر رشد انگل بودند ($P < ۰/۰۵$)، اما غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار SAC اثر معنی‌داری بر تعداد انگل‌ها نداشتند ($P > ۰/۰۵$).

میزان جذب نوری گروه‌های مواجهه که معرف میزان تکثیر پروماستیگوت‌ها بود، مشخص کرد که تنها گروه‌های مواجهه شده با غلظت‌های نهایی ۵ و ۱۰ میلی‌مولار SAC دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد بودند ($P < ۰/۰۵$) و سایر غلظت‌ها اثر معنی‌داری بر تکثیر پروماستیگوت‌ها نداشتند ($P > ۰/۰۵$).

بحث

انگل Leishmania دارای گونه‌های متعدد بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا می‌باشد. انواع گونه‌ها دارای ناقل، میزبان و مخزن اختصاصی خود می‌باشند. گوناگونی میزبان ذخیره و سایر شرایط اپیدمیولوژیک حاکم بر این بیماری مؤید آن است که کنترل عفونت‌های ناشی از Leishmania بسیار مشکل است (۱۶). بنابراین درمان مؤثر می‌تواند یکی از قاطع‌ترین راه‌کارها در جهت کاهش آلام و عوارض اجتماعی- روانی بیماری باشد و در مورد انواعی که انسان خود مخزن بیماری محسوب می‌شود، به امر کنترل و پیشگیری از انتشار بیماری کمک نماید.

خط اول درمان لیشمانیوز جلدی شامل آنتی‌موان‌های ۵ ظرفیتی به خصوص سدیم استیبوگلوکونات و گلوکانتیم است. علاوه بر این که این داروها بسیار سمی و گران هستند، مقاومت دارویی آن‌ها نیز در انگل‌ها گزارش شده است (۲۰-۱۷). خط دوم درمان که شامل داروهایی نظیر پنتامیدین، B amphotericin و Paramomycine می‌باشد، نیز بسیار سمی هستند (۲۳-۲۱،۱۲-۱۱).

متأسفانه هنوز داروی دیگری با اثرات جانبی کمتر و اثر درمانی مناسب علیه لیشمانیوز جلدی یافت نشده است. به همین دلیل استفاده از سایر روش‌های پیشگیری از جمله واکسیناسیون و لیشمانیزاسیون بیشترین توجه را به خود معطوف نموده است. از آن جایی که تا به حال مطالعات انجام شده هیچ واکسنی را که دارای کارایی مناسبی علیه این بیماری باشد، تأیید نکرده است، در دهه‌های اخیر لیشمانیزاسیون به عنوان بهترین راه پیشگیری مطرح شده است (۲۴). طی این روش پروماستیگوت‌ها در محیط‌های کشت سلولی تک فازی در کنار یک ماده‌ی محرک رشد به ویژه سرم جنین گوساله (FCS Fetal calf serum) رشد داده می‌شود و سپس به داخل جلد افراد تزریق می‌گردد (۲۵). عوارض این روش ایمن‌سازی متنوع است و از مهم‌ترین آن‌ها بروز ضایعات Non-healed در محل تزریق می‌باشد. هم اکنون کشت انبوه انگل در کلیه‌ی مطالعات بررسی داروها و تولید واکسن‌های خام غیر زنده بسیار مرسوم است. از طرف دیگر، استفاده از FCS در محیط کشت آنتی‌ژن‌های زنده‌ای که مصارف انسانی دارد، دارای مخاطرات خاص خود و از جمله احتمال انتقال بیماری جنون گاوی و سایر عفونت‌های ویروسی است. بنابراین باید به دنبال مکمل‌های مناسب محیطی بود تا علاوه بر ایمن بودن، بتواند به صورت مؤثر باعث پرولیفراسیون انگل گردد.

مطالعه‌ی حاضر مشخص کرد که ماده‌ی مزبور نه تنها اثر کشندگی بر پروماستیگوت‌های موجود در

محیط کشت را ندارد بلکه در غلظت‌های خاصی باعث افزایش پرولیفراسیون می‌گردد.

طبق نتایج حاصل از بررسی آپوپتوز مشخص شد که مواجهه‌ی پروماستیگوت‌های انگل Leishmania با مقادیر متفاوت SAC با غلظت‌های نهایی ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار هیچ تأثیری علیه انگل ندارد. از طرف دیگر، بررسی پرولیفراسیون مشخص کرد که لوله‌های محیط کشت مواجهه‌شده با غلظت‌های نهایی ۵ و ۱۰ میلی‌مولار دارای بیشترین جذب نوری و بیشترین میزان تکثیر بودند. البته میزان افزایش جذب نوری با شمارش انگل‌ها به طور مستقیم مطابقت دارد. از آن جایی که اشکال Roset در غلظت‌های بالاتر یعنی لوله‌های محیط کشت مواجهه‌شده با غلظت نهایی ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم به ترتیب معادل ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار از ماده‌ی SAC دیده شد، به نظر می‌آید بتوان دو تئوری را مطرح نمود:

ماده‌ی SAC در غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار اثر قابل توجهی بر رشد انگل‌ها نداشت. از غلظت ۵ میلی‌مولار به بالا رشد قابل توجهی دیده شد و این مقدار در غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار به اوج خود رسید و سپس با افزایش غلظت ماده‌ی مزبور، این رشد دارای سیر نزولی شد. می‌توان چنین ادعا کرد که غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار بهترین اثر را بر افزایش رشد پروماستیگوت‌ها نشان داد. از طرف دیگر، میزان اشکال Roset در غلظت‌های نهایی ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار دارای بیشترین مقدار بودند و هیچ آپوپتوزی نیز در آن‌ها دیده نشد. بنابراین می‌توان گفت که احتمال دارد که این ماده در ابتدای مواجهه باعث ایجاد کاهش در رشد پروماستیگوت‌ها شود. با این همه شاید این حالت تنها به صورت استاتیک بوده است، یعنی تنها باعث توقف یا کاهش رشد انگل شده و پس از طی چندین ساعت از مواجهه، ماده‌ی مزبور توسط انگل متابولیزه شده و در نهایت به حدی رسیده است که در رشد انگل اثر قابل توجهی داشته باشد.

از سوی دیگر، می‌توان ادعا کرد که غلظت‌های مزبور نیز باعث افزایش رشد به میزان بسیار بیشتر از غلظت‌های پایین‌تر شده است، ولی چون محیط و مواد غذایی لازم برای انگل محدود بوده است، به طور ظاهری افزایش قابل توجهی در تکثیر آن‌ها دیده نشده است.

در هر دو حالت می‌توان به این نتیجه رسید که اثر پرولیفراسیون SAC به طور کامل وابسته به دوز می‌باشد. به خصوص با در نظر گرفتن تئوری اول می‌توان چنین ادعا کرد که این اثر وابسته به زمان نیز هست؛ چرا که با گذشت زمان و به مقدار مطلوب (Optimum) دوز رسیدن ماده‌ی مزبور، اثر پرولیفراسیون این ماده بر انگل به طور مجدد قابل ملاحظه بوده است.

H_2O_2 یکی از محصولات مهم متابولیسم اکسیژن می‌باشد و تجمع آن می‌تواند باعث شکستگی زنجیره‌ی DNA ژنومی گردد (۲۶). چون انگل Leishmania نیز همانند سایر ارگانیسم‌های هوازی با انواع محصولات سمی حاصل از متابولیسم اکسیژن (ROS یا Reactive oxygen species) و نیتروژن (RNS یا Reactive nitrogen species) ایجاد شده توسط خود انگل مواجه می‌شود، وجود سیستمی در انگل که بتواند این مواد را خنثی کند و باعث بقای انگل گردد، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. این انگل جهت محافظت خود از مسیر تریپانوتیون که باعث

خنثی کردن این مواد از جمله H_2O_2 می‌شود، استفاده می‌کند. چون کارایی این سیستم بسیار کمتر از مسیر کاتالاز موجود در پستانداران است، وجود مواد آنتی‌اکسیدانی که به انگل کمک می‌کند تا این مواد را خنثی نماید و بتواند به صورت مقاوم باقی بماند، بسیار کمک‌کننده خواهد بود و می‌تواند باعث بقای بیشتر انگل در محیط کشت گردد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی AGE (Aged garlic extract) که عمده‌ترین ماده‌ی موجود در آن SAC می‌باشد، به خصوص در غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار ثابت شده است (۲۷). بنابراین این ماده در خنثی کردن مواد آنتی‌اکسیدان می‌تواند به انگل کمک کند و باعث بقای آن در محیط کشت گردد. احتمال دارد که غلظت‌های نهایی ۵ و ۱۰ میلی‌مولار این ماده بتواند اثر مناسبی در راستای کمک به بقای پروماستیگوت‌ها علیه اکسیدان‌های تولیدی در محیط کشت ناشی از خود انگل داشته باشد و بنابراین باعث پایداری، بقا و افزایش رشد شود (۲۹-۲۸).

از طرفی، خاصیت تنظیم ایمنی عصاره‌های مختلف سیر ثابت شده است (۳۰). به این ترتیب این ماده هم در محیط کشت می‌تواند رشد و تکثیر انگل را حمایت نماید و هم پس از ورود به داخل بدن می‌تواند سیستم ایمنی را به سود میزبان رهبری نماید.

همان طور که ذکر شد در این مطالعه اثر پرولیفراسیون و آپوپتوزی SAC بر روی پروماستیگوت‌های Leishmania در شرایط برون‌تنی بررسی گردید و ثابت شد که این ماده با غلظت‌های ذکر شده فاقد اثر کشندگی بر روی انگل می‌باشد. این موضوع به طور کامل متضاد نتیجه‌ای است که در مطالعه‌ی اثر عصاره‌ی دیگری از سیر به نام Ajoene بر پروماستیگوت‌های انگل به دست آمده است (۳۱، ۲۷). در آن مطالعه مشخص شد که Ajoene با غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار دارای اثرات آنتی‌پرولیفراتیو است که از طریق مسدود نمودن مسیرهای متابولیکی بیوسنتز فسفاتیدیل کولین و در نهایت اثر سوء بر نفوذپذیری غشای سلولی می‌تواند باعث مرگ انگل شود (۳۱، ۲۷).

عصاره‌هایی از سیر مانند آلیسین و Ajoene که دارای خاصیت ضد انگلی می‌باشند، از عصاره‌های روغنی هستند، ولی SAC از دسته‌ی عصاره‌های آبی است. به نظر می‌رسد که انواع عصاره‌ها دارای خصوصیات بیوشیمیایی متفاوت باشند. این ماده با در اختیار قرار دادن یک مولکول هیدروژن به مواد اکسیدکننده می‌تواند آن‌ها را خنثی نماید (۳۲). این عامل می‌تواند باعث محافظت انگل از تخریب‌ها و آسیب‌های ناشی از اکسیداتیوها شود (۳۳).

از آن جایی که بعضی از مطالعات اثرات سمی عصاره‌های روغنی گیاهان را بر روی بدن انسان ثابت کرده‌اند (۳۷-۳۴)، به نظر می‌رسد SAC نسبت به عصاره‌های روغنی ماده‌ای مطمئن‌تر است و استفاده از آن برای انواع بیماری‌ها توصیه می‌شود. بنابراین مطالعه‌ی حاضر ثابت می‌کند که نمی‌توان به طور کلی عنوان نمود که سیر دارای اثرات ثابتی بر ارگانیسم‌های زنده است بلکه عصاره‌های متنوع به دلیل دارا بودن خصوصیات بیوشیمیایی متفاوت می‌توانند اثرات مختلفی از خود بروز دهند.

نتیجه‌گیری

از آن جایی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی SAC پیشتر ثابت شده است و در این مطالعه نیز به اثبات رسید

که غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار می‌تواند اثر مناسبی بر بقا، پایداری و افزایش رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت داشته باشد، به نظر می‌رسد می‌تواند به عنوان عاملی محرک جهت رشد پروماستیگوت‌های انگل، مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی، با توجه به وجود اطلاعات ژنومی انگل Leishmania در پایگاه‌های داده می‌توان مطالعات بیشتری در راستای ژنومیکس و پروتئومیکس انجام داد تا بتوان ناحیه یا نواحی هدف برای ماده‌ی SAC را تشخیص داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یزد به دلیل حمایت مالی برای انجام این پروژه نهایت تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از دانشکده‌ی پیراپزشکی نهایت سپاسگزاری را دارند؛ چرا که بدون در اختیار قرار دادن آزمایشگاه انگل‌شناسی این دانشکده، انجام این پروژه به سختی امکان‌پذیر بود.

همچنین از کارشناس محترم آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پیراپزشکی سرکار خانم مهین غفورزاده که در طول انجام پروژه ما را حمایت نمودند، قدردانی می‌نماییم. لازم می‌دانیم از سرکار خانم زارع نیز که در قسمت خوانش ELISA ما را یاری رساندند، نهایت تشکر را داشته باشیم.

References

1. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. Phytochemistry 2005; 66(17): 2056-71.
2. Lamidi M, DiGiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C, Rondi ML, et al. In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. J Ethnopharmacol 2005; 102(2): 185-90.
3. Heyneman D. Medical parasitology. In: Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EL, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, editors. Medical microbiology. 20th ed. Norwalk, Conn: Appleton and Lange; 1995. p. 563-4.
4. Asmar M, Farahmand M, Aghighi Z, Ghaemi N, Ayatollahi A. In vitro and In vivo evalution of therapeutic effects of vinca major alkaloids on Leishmania major. J Sch Public Health Inst Public Health Res 2002; 1(2): 1-8.
5. Doroodgar A, Arbabi M, Razavi M, Mohebali M, Sadr F, Tashakkor Z. Effect of artemisia sieberi extract on Leishmania major ulcers in BALB/c mice. Feyz 2007; 11(3): 52-6.
6. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 2005; 12(6-7): 514-35.
7. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol 2000; 25(5): 363-70.
8. Ardehali S, Rezayi HR, Nadim A. Leishmania and leishmaniasis. Tehran, Iran: Iran University Press; 1985.
9. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. Parasitol Int 2005; 54(2): 119-22.
10. Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. Trends Parasitol 2003; 19(5): 232-9.
11. do Socorro S Rosa Mdo, Mendonca-Filho RR, Bizzo HR, de AR, I, Soares RM, Souto-Padron T, et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(6): 1895-901.
12. Ma G, Khan SI, Jacob MR, Tekwani BL, Li Z, Pasco DS, et al. Antimicrobial and antileishmanial activities of hypocrellins A and B. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(11): 4450-2.
13. Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science 1985; 228(4704): 1154-60.
14. Kessler RC, Davis RB, Foster DF, Van Rompay MI, Walters EE, Wilkey SA, et al. Long-term

trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the United States. Ann Intern Med 2001; 135(4): 262-8.
15. Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, et al. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. Planta Med 1994; 60(3): 214-7.
16. Momeni A, Amin Javaheri MA, Emam Jome M. Detection of therapeutic and side effects of glucanthim against cutaneous leishmaniasis. Nabz 1992; 2: 16-7.
17. Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. Rev Infect Dis 1988; 10(3): 560-86.
18. Lee SA, Hasbun R. Therapy of cutaneous leishmaniasis. Int J Infect Dis 2003; 7(2): 86-93.
19. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res 2006; 123(3): 399-410.
20. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. J Infect Chemother 2004; 10(6): 307-15.
21. Ramos H, Milhaud J, Cohen BE, Bolard J. Enhanced action of amphotericin B on Leishmania mexicana resulting from heat transformation. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(8): 1584-9.
22. Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(8): 1630-4.
23. Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against Leishmania donovani in immunodeficient scid mice. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(6): 1872-5.
24. Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, et al. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. Vaccine 2005; 23(28): 3642-8.
25. Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1983; 76(4): 377-83.
26. Deutsch JC. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. Anal Biochem 1998; 255(1): 1-7.
27. Ledezma E, Jorquera A, Bendezu H, Vivas J, Perez G. Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various Leishmania species: ultrastructural study. Parasitol Res 2002; 88(8): 748-53.
28. Nencini C, Menchiari A, Franchi GG, Micheli L. In vitro antioxidant activity of aged extracts of some Italian Allium species. Plant Foods Hum Nutr 2011; 66(1): 11-6.
29. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 2005; 53(6): 1841-56.
30. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic induces a shift in cytokine pattern in Leishmania major-infected BALB/c mice. Scand J Immunol 2000; 52(5): 491-5.
31. Urbina JA, Marchan E, Lazardi K, Visbal G, Apitz-Castro R, Gil F, et al. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in Trypanosoma cruzi by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. Biochem Pharmacol 1993; 45(12): 2381-7.
32. Diouf PN, Cloutier A. Study on chemical composition and anti-inflammatory activities of hot water extract Picea mariana bark and its proanthocyanidin-rich fractions. Food Chemistry 2009; 113(4): 897-902.
33. Hu M, Skibsted LH. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (Nelumbo nuficera). Food Chemistry 2002; 76(3): 327-33.
34. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect 1999; 1(2): 125-9.
35. Ankri S, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelman D. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of Entamoeba histolytica. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(10): 2286-8.
36. Lun ZR, Burri C, Menzinger M, Kaminsky R. Antiparasitic activity of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animal pathogenic protozoa (Trypanosoma sp., Entamoeba histolytica and Giardia lamblia) in vitro. Ann Soc Belg Med Trop 1994; 74(1): 51-9.
37. Anthony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? Trends Parasitol 2005; 21(10): 462-8.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 19.12.2012
Vol. 31, No. 225, 3rd Week, April 2013
Accepted: 10.03.2013

Effects of S-Allyl-Cysteine on Survival, Apoptosis, and Proliferation of *Leishmania Major* in Vitro

Gilda Eslami PhD[1], Ali Shams PhD[2], Mehran Fasahat[3], Hassan Ashoori[4], Zahra Hatefi[4], Yasamin Nabipour[4], Farzaneh Mirzaei[5], Seyed Hossein Hejazi PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: Many studies have suggested the benefits of garlic oil extracts against *Leishmania* parasites. Recent research has proved that these derivatives (such as allicin) are cytotoxic and therapeutic effects of garlic are in fact due to an odorless compound (S-allyl-cysteine). Considering the small number of studies in this field, we evaluated the effectiveness of S-allyl-cysteine on survival, apoptosis, and proliferation of *Leishmania major* promastigotes in vitro.

Methods: In this study *Leishmania major* promastigotes *(MRHO/IR/75/ER)* were used. The parasites were first cultured and then treated with S-allyl-cysteine at end concentrations of 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, and 50.0 mM. Their survival, apoptosis, and proliferation was assessed after 72 hours.

Findings: None of the concentrations of S-allyl-cysteine could induce apoptosis in parasite promastigotes. Lower concentrations (5.0 and 10.0 mM) of S-allyl-cysteine had greatest effect on proliferation. On the other hand, direct observation showed that cultures comprising S-allyl-cysteine at end concentration of 20.0, 40.0, and 50.0 mM formed more rosettes.

Conclusion: The antioxidant effects of S-allyl-cysteine have been previously proved. Similarly, this study showed that some concentrations of S-allyl-cysteine could affect the survival and growth of promastigotes in culture medium. Therefore, this substance seems to be a good stimulating factor for growth of parasite promastigotes in culture media.

Keywords: Leishmania major, S-allyl-cysteine, Apoptosis, Proliferation

Citation: Eslami G, Shams A, Fasahat M, Ashoori H, Hatefi Z, Nabipour Y, et al. **Effects of S-Allyl-Cysteine on Survival, Apoptosis, and Proliferation of *Leishmania Major* in Vitro.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(225): 121-30

1- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3- Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4- Student, Department of Laboratory Sciences, Student Research Committee, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
5- MSc Student, Department of Parasitology, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
6- Associate Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center AND Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.mui.ac.ir