

## The Effect of Artemether-induced Apoptosis in Promastigotes of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) under In-vitro Conditions

Parisa Ebrahimisadr<sup>1</sup>, Fatemeh Ghaffarifar<sup>2\*</sup>, Zuhair Mohammad Hassan<sup>3</sup>, Nasibeh Beheshti<sup>1</sup>

1- M.Sc, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: ghafarif@modares.ac.ir

Received: 14/Jan/2012, Accepted: 26/Jun/2012

### Abstract

**Objective:** Leishmaniasis is one of the significant causes of morbidity and mortality in several countries. It is an important problem in endemic areas such as Iran. The goal in treatment of leishmaniasis is to reduce the disease period and leave no evidence of any remaining scars or lesions. A derivative of artemisinin is artemether. Scientists believe that the strong action of artemether against parasites is due to the presence of an endoperoxide bridge. Due to problems in the treatment of *Leishmania major*, in this research we have studied the effect of artemether on *Leishmania major* under in vitro conditions.

**Methods:** Parasites were cultured in NNN and RPMI, after which artemether at concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100 µg/ml were used for the promastigote assay. Apoptosis was detected by flow cytometry and DNA ladder assay.

**Results:** The inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of artemether was determined to be 25 µg/ml. The percentage of apoptotic promastigotes at 25 µg/ml of artemether was 42.28. The results of DNA fragmentation show that exposure of *Leishmania major* promastigote cells to 25 µg/ml of artemether lead to DNA fragmentation.

**Conclusion:** We have proven the effect of artemether on apoptosis of *Leishmania major* by flow cytometry and the DNA ladder assay.

**Keywords:** *Leishmania major*, Artemether, Apoptosis, Flow Cytometry

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 1-10

# بررسی اثر داروی آرتمتر بر مرگ سلولی پروماستیگوت‌های سویه ایرانی (MRHO/IR/75/ER) انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

پریسا ابراهیمی صدر<sup>۱</sup>، فاطمه غفاری فر<sup>۲\*</sup>، زهیر محمد حسن<sup>۳</sup>، نسیم بهشتی<sup>۱</sup>

۱- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی

Email: ghafarif@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۴/۰۶

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۲۵

## چکیده

هدف: لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین عوامل میرایی و ناخوشی در چندین کشور و از معضلات مهم مناطق اندمیک از جمله ایران است. در درمان لیشمانیوز همواره اهدافی همچون به حداقل رساندن دوره بیماری و باقی نگذاشتن اثری از جوشگاه در محل ایجاد زخم مد نظر بوده است. آرتیمیزین و مشتقات آن از مهم‌ترین داروهای ضد مالاریایی است. یکی از مشتقات آرتیمیزین، آرتمتر است. دانشمندان بر این باورند که عمل قدرتمند آرتمتر علیه انگل‌ها به دلیل حضور پل اندوپراکسید است. با توجه به مشکلات روش‌های درمانی لیشمانیوز در این تحقیق اثر داروی آرتمتر در درمان لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: پس از تکثیر انگل در محیط اختصاصی NNN و RPMI میزان کشتندگی و توقف رشد و تکثیر پروماستیگوت‌ها توسط داروی آرتمتر با غلظت‌های مختلف ۵ و ۱۰ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها به وسیله فلوسایتومتری و DNA Ladder ارزیابی شد.

نتایج: براساس نتایج به‌دست آمده، غلظت مهارکنندگی آرتمتر (IC<sub>50</sub>)، ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر شد. میزان مرگ برنامه‌ریزی شده پروماستیگوت به وسیله استفاده از غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آرتمتر با روش فلوسایتومتری ۴۲/۲۸ درصد شد. نتایج تکه تکه شدن DNA سلول‌های پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در مواجهه با آرتمتر نشان داد که مواجهه پروماستیگوت‌ها با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب قطعه قطعه شدن DNA می‌شود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از فناوری‌های مختلف فلوسایتومتری و DNA Ladder اثر داروی آرتمتر بر مرگ سلولی سویه ایرانی لیشمانیا ماژور اثبات شد.

کلیدواژگان: لیشمانیا ماژور، آرتمتر، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، فلوسایتومتری

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۱-۱۰

## مقدمه

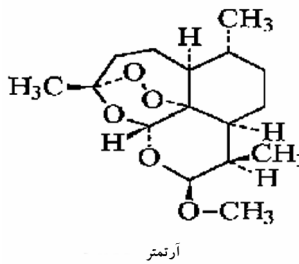
است که بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مورد تهدید این بیماری قرار می‌گیرند [۱]. این بیماری در سه شکل کلی جلدی، جلدی-مخاطی و احشایی مشاهده می‌شود [۲].

لیشمانیوز (Leishmaniasis) یکی از مهم‌ترین عوامل میرایی و ناخوشی در چندین کشور است. تخمین زده شده

### اثر داروی آرتمتر بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده انگل لیثمانیا ماژور

فعال وجود دارد [۱۵]. این مواد سال‌ها در درمان مالاریا کاربرد داشته [۱۶] و اخیراً آثار ضد سرطانی آن‌ها مورد پژوهش قرار گرفته است [۱۷، ۱۸]. لازم به ذکر است که اگر چه آرتمیزینین خود دارویی فعال و مؤثر است ولی به دلیل محدودیت‌هایی چون حلالیت کم و نیمه عمر کوتاه در بدن، مشتقات نیمه صنعتی آن با هدف افزایش فعالیت زیستی و بهبود حلالیت آن در آب یا چربی ساخته شده‌است [۱۵]. از آن‌جا که ساختار آرتمتر بسیار به ترکیب مادر خود آرتمیزینین شباهت دارد، مکانیسم عمل مشابهی برای آن در نظر گرفته می‌شود. در این ارتباط دو فرضیه پیشنهاد شده است که پل اندوپراکسید و حضور آهن در هر دو نقش کلیدی دارد؛ فرضیه اول این است که پیوند اندوپراکسید می‌تواند در حضور آهن دو ظرفیتی شکست کاهشی پیدا کند و رادیکال‌های آزاد با مرکزیت کربن تشکیل شود.

فرضیه دوم این است که ساختار حلقه‌ای آرتمتر می‌تواند با پروتونه شدن ( $H^+$ ) یا تشکیل کمپلکس با یون فلزی آهن باز شود و رادیکال‌های آزاد با مرکزیت اکسیژن تشکیل شود. رادیکال‌های آزاد کربنی و اکسیژنی ایجاد شده که از نظر ساختاری با هم متفاوت هستند، در مرحله بعد به طور انتخابی پروتئین‌های مختلف سلول را آلیکله و هیدروکسیله می‌کند و آثار توکسیک به جا می‌گذارد [۱۹].



شکل ۱ ساختار شیمیایی آرتمتر

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) یک فرایند فیزیولوژیکی حیاتی برای حفظ هموستازی (Homeostasis) است. زمانی که سلول تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی یا حتی درونی همانند اشعه‌های یونیزان، داروهای ایجاد کننده

معمولاً برای درمان لیثمانیوز از داروهای شیمیایی [آنتی‌موآن (Antimonate) ۳ و ۵ ظرفیتی] شامل گلوکانتیم (Glucantime)، بنتوستام (Pentostam)، آلپورینول (Allopurinol) و همچنین از داروهای آمفوتریسین B (Amphotericin B) و لیپوزومال آمفوتریسین B (Liposomal Amphotericin B) استفاده می‌شود. البته بدین منظور از داروهای موضعی نظیر سولفات بربرین (Berberine Sulphate)، مپاکرین (Mepacrine)، هیدروکلراید امیتین (Emetine Hydrochloride)، پاراموایسین (Paromomycin) همراه با جنتامایسین (Gentamicin) و تری کلر استیک اسید (Trichloro-Acetic Acid) و از روش‌های فیزیکی مانند یخ خشک (سرما درمانی)، گرما درمانی، اشعه ایکس و یا داروهای محلی نیز استفاده می‌شود [۱، ۳-۱۰]. در استفاده از این روش‌های درمانی مشکلاتی از قبیل عود بیماری، مقاومت به داروها، عوارض جانبی داروها، ایجاد عفونت ثانویه باکتریایی و هزینه بالا وجود دارد؛ بنابراین گروهی از محققین از گیاهان دارویی برای درمان لیثمانیوز استفاده کرده‌اند که شامل پسچیرا استرالیس (*Peschiera australis*)، پسچیرا وانهروکی (*Peschiera vanherokii*)، آلترا روزا (*Althaea* *rosa*)، آلترا افسینالیس (*Althaea officinalis*)، لگومینوزا فاباسه (*Leguminosa fabaceae*) مالواسه (*Malvaceae*)، لیتراسه (*Lythraceae*)، نیژلا ساتیوا (*Nigella sativa*)، آلکانا تینکتوریا (*Alkanna tinctoria*)، پگاموم هارمالا (*Pegamum harmala*)، افوربیا میزینیتس (*Euphorbia mysinites*) است و دارای نتایج مثبتی بوده‌اند [۱۱-۱۴]. بنابراین مطالعه در پی یافتن داروهای مناسب و جایگزین در درمان لیثمانیوز از اولویت‌های ضروری است. آرتمتر (Artemether) مشتق متیل اتری و محلول در چربی آرتمیزینین (Artemisinin) (آرتمیزینین خود از برگ‌های گیاه آرتمیزیا (*Artemisia*) کشف شده است) و دارای فرمول ساختاری  $C_{15}H_{22}O_5$  و وزن مولکولی ۲۹۸/۴ است. در شکل ۱ ساختار شیمیایی آرتمتر نشان داده شده است. آرتمیزینین و مشتقات آن از جمله آرتمتر، ترکیبات سزکویی ترپن لاکتون (Sesquiterpene Lactone) با منشأ گیاهی است که در ساختارشان یک پل اندوپراکسید بسیار

تهیه شد. در ابتدا ۱ میلی گرم از آرتومتر در ۰/۵ میلی لیتر از اتانول حل شد و سپس به آرامی ۰/۵ میلی لیتر از آب مقطر استریل به آن اضافه شد. برای بهتر حل شدن دارو، از حجم ۱۰۰ میکرولیتر اتانول و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد تا در نهایت حجم ۱ میلی لیتر به دست آید.

### نحوه شمارش پروماستیگوت‌ها

برای کشت پروماستیگوت‌ها ابتدا شمارش انجام شد؛ بدین ترتیب که با استفاده از لام نئوبار (neobar) و در ناحیه شمارش گلبول‌های سفید تعداد انگل شمارش و در  $10^4$  ضرب شد تا تعداد انگل در میلی لیتر به دست آید. تعداد انگل پس از شمارش به  $10^6$  رسانده شد.

### روش انجام آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها

پلیت‌های ۲۴ چاهکی آماده و استریل در زیر هود با شرایط کاملاً استریل قرار داده شد و سپس به سه چاهک اول مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از انگل حاوی پروماستیگوت ( $10^6$ ) اضافه شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI 1640 + ۲۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum) به آن اضافه شد؛ این چاهک به عنوان کنترل آزمون است و فاقد هیچ گونه دارویی است. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ و ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر دارو را برداشته و به چاهک‌ها اضافه شد و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از انگل حاوی پروماستیگوت ( $10^6$ ) حجم نهایی به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام شد و یک پلیت به مدت ۲۴ ساعت، پلیت دوم به مدت ۴۸ ساعت و پلیت سوم به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. همچنین در هر پلیت یکی از چاهک‌ها فقط دارای پروماستیگوت و محیط و فاقد هیچ گونه دارویی است که این چاهک به عنوان کنترل آزمون است. پس از این مدت پروماستیگوت‌ها توسط لام نئوبار شمارش شد. همچنین آزمایش سه مرتبه تکرار شد.

سمیت سلولی و... قرار می‌گیرد، محتویات آن از جمله DNA، دستخوش تغییراتی می‌شود که در صورت ادامه حیات آن منجر به ناهنجاری‌هایی شدیدی از جمله سرطانی شدن سلول می‌شود. عوامل دیگری نظیر برخی باکتری‌های بیماری‌زای داخل سلولی، ویروس و انگل‌ها نیز در خلال عفونت‌زایی خود با تغییر در برخی مسیرهای متابولیکی و بیوشیمیایی داخل سلولی می‌توانند، در هدایت سلول به سمت این نوع خاص از مرگ دخیل باشند. در ابتدا تصور می‌شد که پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فقط در جانداران پر سلولی اتفاق می‌افتد اما مطالعات جدید نشان می‌دهد که در یوکاریوت‌های تک یاخته‌ای نظیر لیشمانیا نیز اتفاق می‌افتد [۲۰]. امروزه یکی از روش‌های متداول تشخیص وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول، الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز برای بررسی حضور DNA Ladder است. به تازگی فلوسایتومتری (Flow Cytometry) به عنوان روش دقیق و سریع برای بررسی روش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در طیف وسیعی از سلول‌ها استفاده می‌شود. آنچه موجب اهمیت روش فلوسایتومتری می‌شود آن است که با کمک این روش می‌توان پارامترهای مختلفی را در یک جمعیت سلولی بررسی نمود. مطالعات سمیت سلولی و آثار القایی مرگ روی لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) توسط داروهای مختلف صورت گرفته ولی تاکنون در کشور ما مطالعه فرآیند مرگ در اثر مصرف داروی آرتومتر در سویه ایرانی لیشمانیا ماژور (و حتی دیگر سویه‌های لیشمانیا ماژور) انجام نشده است. هدف از این مطالعه یافتن دوز مؤثر داروی آرتومتر بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سویه رایج در کشور است.

### مواد و روش‌ها

#### آماده‌سازی داروی آرتومتر

داروی آرتومتر از شرکت Exim pharm CO (آمریکا) خریداری شد. محلول استوک آرتومتر به صورت تازه با نسبت یک به یک (حجمی/حجمی) اتانول و آب مقطر استریل

اثر داروی آرتمتر بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده انگل لیشمانیا ماژور

بافر انتقال (Loading Buffer) مخلوط و در داخل چاهک‌های ژل ریخته شد. پس از آن به مدت ۴۰ دقیقه در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز انجام شد. علاوه بر نمونه‌ها از نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی به عنوان کنترل استفاده شد. نتیجه ژل با استفاده از ژل داگ (Gel Doc) بررسی و آزمایش دو مرتبه تکرار شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون آماری تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (Oneway ANOVA) با سطح اطمینان ( $P < 0/05$ ) و من‌ویتنی (Mann Whitney) به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

### نتایج

#### نتایج حاصل از آزمون ممانعت از رشد

##### پروماستیگوت‌ها

بعد از مجاور نمودن پروماستیگوت‌ها با غلظت‌های مختلف دارو به میزان ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سه پلیت جداگانه میزان مهار رشد پروماستیگوت‌ها ( $IC_{50}$ ) به ترتیب بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت خوانده شد. نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ نشان داده شده است.  $IC_{50}$  لیشمانیا ماژور در مواجهه با آرتمتر با استفاده از آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

#### بررسی مرگ سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده

##### لیشمانیا ماژور با استفاده از فلوسایتومتری

درصد سلول‌های زنده، دچار مرگ برنامه‌ریزی شده و همچنین دچار مرگ نکروز با استفاده از فلوسایتومتری در زمان ۷۲ ساعت بررسی شد. نتایج تجزیه و تحلیل پروماستیگوت‌های مواجهه شده با Annexin V- FLUOS نشان داد که پس از

#### بررسی مرگ سلولی به وسیله فلوسایتومتری

فلوسایتومتری بر این اصل استوار است که اشعه نور لیزر تابیده شده به یک جمعیت سلول دچار شکست می‌شود. بررسی تفرق نور حاصل در جهات مختلف می‌تواند اطلاعاتی در مورد اندازه شکل و ساختار سلول ارائه دهد. برای افتراق سلول‌های دچار نکروز و دچار مرگ برنامه‌ریزی شده پروماستیگوت‌های مواجهه شده با دوزهای مختلف آرتمتر از روش رنگ‌آمیزی آنکسین V (Annexin-V) استفاده شد.

برای انجام آزمون می‌توان از رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیویدید (Propidium Iodide: PI) و آنکسین جداگانه استفاده کرد که در این مطالعه برای دقت بیشتر از کیت شرکت Roche (آلمان) استفاده شد.

سلول‌های مواجهه شده با غلظت‌های مختلف آرتمتر و همچنین سلول‌های کنترل توسط محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) خنک در ۱۴۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و شسته شد. مطابق برنامه به سلول‌های تهنشین شده ۱۰۰ لاندا محلول آنکسین V و ۱۰۰ لاندا محلول PI اضافه شد. سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد. شدت رنگ آنکسین V جذب شده به سلول‌ها توسط دستگاه FACSCaliber بررسی شد. نتایج توسط نرم‌افزار Win MDI تجزیه و تحلیل شد. همچنین آزمایش به تعداد دو بار تکرار شد.

#### ارزیابی سلول براساس محتوی DNA خرد شده

##### (DNA Fragmentation)

آثار آرتمتر بر DNA سلول‌های مواجهه شده با دارو توسط آزمون ژل الکتروفورز DNA خرد شده بررسی شد. برای انجام کار از Apoptotic DNA Ladder Kit شرکت Roche (آلمان) استفاده شد. تخلیص DNA از سلول‌های کشت داده شده با غلظت‌های مختلف دارو (۵۰ و ۲۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام شد، سپس ۵ لاندا از نمونه‌ها با ۵ میکرولیتر

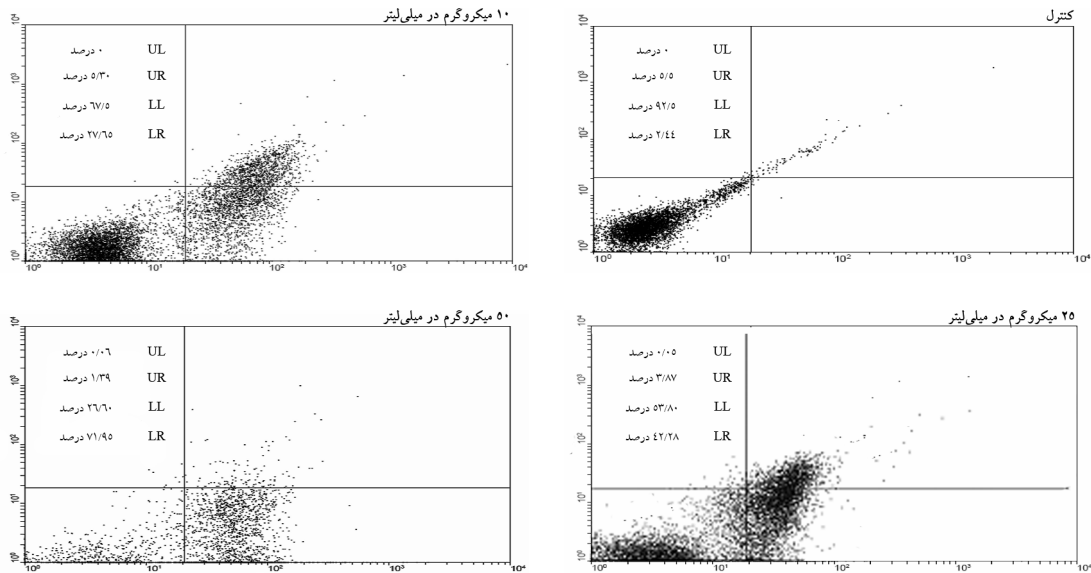
سلولی) شده بودند. با افزایش دوز دارو میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نیز افزایش پیدا کرد؛ بدین ترتیب که در گروه کنترل و غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ به ترتیب ۲/۴۴، ۲۷/۶۵، ۴۲/۲۸ و ۷۱/۹۵ بود. شکل ۱ درصد سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده، نکروز و سلول‌های زنده را نشان می‌دهد.

۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌های لیثمانیا ماژور با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از آرتمر، ۴۲/۲۸ درصد سلول‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی شده بودند و تنها ۰/۰۵ درصد سلول‌ها PI مثبت بودند (دچار نکروزیس شده بودند). در حالی که تنها ۲/۴۴ درصد سلول‌های کنترل آنکسین V مثبت (دچار مرگ برنامه‌ریزی شده

جدول ۱ نتایج حاصل از آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها براساس میانگین و انحراف معیار شمارش با لام نوبار در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (x10<sup>6</sup>)

۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۰	۵	کنترل	غلظت آرتمر
						شمارش پروماستیگوت‌های زنده بعد از
۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۳۴ ± ۰/۰۴	۰/۵۷ ± ۰/۰۷	۰/۶۶ ± ۰/۰۹	۰/۷۹ ± ۰/۱	۱/۳ ± ۰/۱۲	۲۴ ساعت
۰/۱۹ ± ۰/۰۱	۰/۳۱ ± ۰/۰۲	۰/۵۱ ± ۰/۰۳	۰/۶۳ ± ۰/۰۷	۰/۷۶ ± ۰/۱۱	۱/۷ ± ۰/۱۸	۴۸ ساعت
۰/۱۸ ± ۰/۰۲	۰/۲۹ ± ۰/۰۲	۰/۴۹ ± ۰/۰۶	۰/۶۱ ± ۰/۱۲	۰/۷۴ ± ۰/۱۵	۱/۹ ± ۰/۲	۷۲ ساعت

نتایج فوق میانگین ۳ بار تکرار است. اختلاف بین گروه‌هایی که غلظت‌های مختلف دارو را گرفته‌اند با گروه‌های کنترل از لحاظ آماری با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).



شکل ۱ نتایج فلوسایتومتری پروماستیگوت‌ها در حضور داروی آرتمر با غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و گروه کنترل بدون دارو پس از ۷۲ ساعت؛ محور X مربوط به آنکسین V و محور Y مربوط به PI است. UL (Upper Left) ناحیه چپ و بالا (نکروز)، UR (Upper Right) ناحیه راست و بالا (مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری)، LL (Low Left) ناحیه چپ و پایین (سلول زنده)، LR (Low Right) ناحیه راست و پایین (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی)

اثر داروی آرتمتر بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده انگل لیشمانیا ماژور

است. تاکنون دارویی مؤثر در کوتاه مدت که فاقد آثار جانبی بر بیمار نیز باشد به دست نیامده است. آرتمتر از داروهای جدیدی است که انتظار می‌رود در درمان لیشمانیا مؤثر باشد. این دارو در درمان بیماری‌های انگلی از جمله شیستوزوما (*Schistosoma*)، فاسیولا (*Fasciola*) [۲۱]، کلونورکیس (*Clonorchis*) [۲۲]، مالاریا (*Malaria*) [۱۶] مؤثر است. در مورد شیستوزوما تحقیقی توسط زیاو (Xiao) صورت گرفته که طبق نتیجه این تحقیق آرتمتر می‌تواند از اثر کشندگی شیستوزومیازیس (*Schistosomiasis*) جلوگیری کند. مطالعات نشان می‌دهد که آرتمتر در مورد شیستوزومیازیس بیشتر بر مرحله لاروی انگل اثر دارد [۲۳].

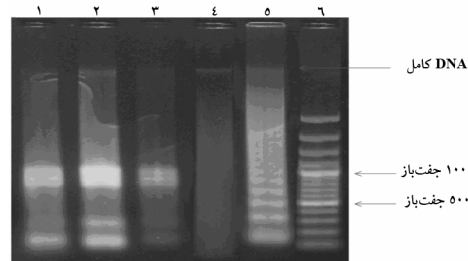
درمان شیستوزوما ژاپونیکوم (*Schistosoma japonicum*)، شیستوزوما مانسونی (*Schistosoma mansoni*) و شیستوزوما هماتوبیوم (*Schistosoma haematobium*) به وسیله آرتمتر به ترتیب به مدت ۲، ۳ و ۴ هفته زمان نیاز دارد [۲۳-۲۵]. با توجه به اثر آرتمتر بر مرحله لاروی انگل احتمال می‌دهند که آرتمتر می‌تواند بر سایر ترماتودها (Trematode) نیز مؤثر باشد. تحقیقی درباره آثار آرتمتر و تریکلابندازول (Triclabendazole) بر فاسیولا ژیگانتیکای (*Fasciola gigantica*) بالغ در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) توسط شالابی (Shalaby) صورت گرفته است. در این مطالعه اثر آرتمتر بر فلوک‌های بالغ به وسیله میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شده است. محققان فعالیت فاسیولا کشی آرتمتر را در مورد فاسیولا هپاتیکا (*Fasciola hepatica*) در شرایط درون‌بدنی (In vivo) و شرایط آزمایشگاهی بررسی کرده‌اند [۲۶]. ترماتودها درست مثل انگل مالاریا برای تغذیه خود باید هموگلوبین میزبان را بلعند. بنابراین به نظر می‌رسد که آرتمتر می‌تواند به وسیله هم یا ترکیبات آهنی دیگر با تولید کردن ترکیبات سمی یا رادیکال‌های آهن آزاد فعال شود [۲۷].

در این مطالعه دوز IC<sub>50</sub> آرتمتر با استفاده از آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها بعد از ۷۲ ساعت، ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. بررسی لیشمانیا ماژور با

## آزمایش DNA خرد شده سلول‌های تیمار شده با آرتمتر

یکی از ویژگی‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در جانداران پر سلولی خرد شدن DNA ژنومی به قطعات کوچک‌تر الیگونوکلوئوزومی است. این اتفاق یکی از نشانه‌های مهم مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است.

هنگام تماس سلول با غلظت کشنده دارو و ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده، قطعه قطعه شدن DNA ژنومیک به قطعات الیگونوکلوئوزومی به صورت Ladder در الکتروفورز ژل آگاز دیده می‌شود و در سلول‌های کنترل قابل مشاهده نیست. نتایج DNA خرد شده سلول‌های پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در مواجهه با آرتمتر نشان داد که مواجهه پروماستیگوت‌ها با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب قطعه قطعه شدن DNA در اندازه‌های ۱۲۰، ۳۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ جفت‌بازی می‌شود در حالی که در سلول‌های کنترل هیچ نوع خرد شدن DNA در آزمون ژل الکتروفورز مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲ الکتروفورز ژل آگاز DNA خرد شده پروماستیگوت‌های درمان شده با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون (خط ۱-۳)، کنترل (خط ۴) سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده استاندارد (خط ۵)، DNA نشانگر (خط ۶).

## بحث

از دلایل اصلی شکست درمان موفقیت‌آمیز لیشمانیوز، مقاومت دارویی است. تغییر پاسخ بالینی به گلوکانتیم و پنتوستام از مشکلات همیشگی درمان لیشمانیا ماژور در ۵۰ سال گذشته بوده

که به وسیله آن حفظ و بقای گونه انجام شود [۲۸]. در این بررسی با استفاده از فناوری‌های مختلف فلوسایتومتری و DNA Ladder اثر داروی آرتمتر بر مرگ سلولی پروماستیگوت‌های سویه ایرانی لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی اثبات شد. بنابراین با نتایج به‌دست آمده می‌توان برای ادامه تحقیقات از داروی آرتمتر در درمان لیشمانیا ماژور روی حیوانات آزمایشگاهی در شرایط درون‌بدنی بهره جست. با توجه به مقاومت دارویی لیشمانیا ماژور، محققان حاضر پیشنهاد می‌کنند که با استاندارد کردن داروی آرتمتر و ارزیابی بهتر نتایج در این زمینه روش مؤثرتری برای درمان حاصل شود.

از محدودیت‌های استفاده از این دارو گران بودن آن است و در صورتی که بتوان این دارو را در داخل کشور تهیه کرد می‌توان بر این محدودیت نیز غلبه کرد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس بابت حمایت مالی از این تحقیق را اعلام می‌دارند.

استفاده از فلوسایتومتری نیز نشان داد که بیشترین میزان مرگ برنامه‌ریزی شده پس از ۷۲ ساعت مواجهه با دارو اتفاق می‌افتد به طوری که پس از ۷۲ ساعت، ۴۲/۲۸ درصد پروماستیگوت‌ها در مواجهه با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از آرتمتر دچار مرگ برنامه‌ریزی شدند. از دیگر مزایای تشخیصی آنکسین V توانایی افتراق بین سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده، سلول‌های دچار نکروز و سلول‌های زنده است. از موارد نشان دهنده اثر آرتمتر بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، خرد شدن DNA به صورت قطعه قطعه است. نتایج DNA خرد شده نشان داد که مواجهه پروماستیگوت‌ها با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی تغییرات ریخت‌شناختی چندی نظیر فشردگی کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA ژنومی، گرد شدن و چروکیدگی سلول اتفاق می‌افتد. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در انگل‌های تریپانوزوماتیدها (Trypanosomatid) می‌تواند در پاسخ به حالات استرس و تحریکی گوناگون نظیر داروها و اشعه ایجاد شود. بنابراین مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در انگل‌های تریپانوزوماتیدها (Trypanosomatidae) شامل لیشمانیا و تریپانوزوم (*Trypanosoma*) ممکن است راهی را به وجود آورد

## منابع

- [1] Akhondzadeh S. Encyclopedia of Iranian Medicinal Plants. Tehran: Arjomand Press 2000; p: 199-209. (Persian)
- [2] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27(5): 305-18.
- [3] Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Horwith GS, Murray HW. Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. Ann Intern Med 1997; 127(2): 133-7.
- [4] Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology 1997; 114 Suppl: S91-9.
- [5] Soussi N, Milon G, Colle JH, Mougneau E, Glaichenhaus N, Goossens PL. Listeria monocytogenes as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen of Leishmania major. Infect Immun 2000; 68(3): 1498-506.
- [6] Mauël J. Vaccination against Leishmania



- infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2(3): 201-26.
- [7] Dietze R, Fagundes SM, Brito EF, Milan EP, Feitosa TF, Suassuna FA, Fonschiffrey G, Ksionski G, Dember J. Treatment of kala-azar in Brazil with Amphotecil (amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(3): 309-11.
- [8] Das N, Mahato SB, Naskar K, Ghosh DK, Basu MK. Targeting of urea stibamine encapsulated in liposomes to reticulo-endothelial system for the treatment of experimental leishmaniasis. *Biochem Med Metab Biol* 1990; 43(2): 133-9.
- [9] Abahusein A, Larbi EB, al-Khawajah A, al-Gindan Y, Jain S. Evaluation of topical ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *East Afr Med J* 1992; 69(1): 14-7.
- [10] Méndez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol* 2001; 166(8): 5122-8.
- [11] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 564-82.
- [12] Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H, Croft SL: In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Trop* 2000; 77(3):307-314.
- [13] Berman JD, Ksionski G, Chapman WL, Waits VB, Hanson WL. Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphotecil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(9): 1978-80.
- [14] Muñoz V, Moretti C, Sauvain M, Caron C, Porzel A, Massiot G, Richard B, Le Men-Olivier L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (syn. *Tabernaemontana van heurkii*). *Planta Med* 1994; 60(5): 455-9.
- [15] van Agtmael MA, Eggelte TA, van Boxtel CJ. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20(5): 199-205.
- [16] Falade C, Makanga M, Premji Z, Ortmann CE, Stockmeyer M, de Palacios PI. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine (Coartem) tablets (six-dose regimen) in African infants and children with acute, uncomplicated falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99(6): 459-67.
- [17] Chen T, Li M, Zhang R, Wang H. Dihydro-artemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy. *J Cell Mol Med* 2009; 13(7): 1358-70.
- [18] Chen H, Sun B, Pan S, Jiang H, Sun X. Dihydroartemisinin inhibits growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs* 2009; 20(2): 131-40.
- [19] Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol* 2006; 36(14): 1427-41.
- [20] Hamann A, Brust D, Osiewacz HD. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Trends Microbiol* 2008; 16(6): 276-83.
- [21] Keiser J, Rinaldi L, Veneziano V, Mezzino L, Tanner M, Utzinger J, Cringoli G. Efficacy and safety of artemether against a natural *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasitol Res* 2008;

- 103(3): 517-22.
- [22] Keiser J, Vargas M. Effect of artemether, artesunate, OZ78, praziquantel, and tri-bendimidine alone or in combination chemotherapy on the tegument of *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Int* 2010; 59(3): 472-6.
- [23] Xiao S, Utzinger J, Chollet J, Endriss Y, N'Goran EK, Tanner M. Effect of artemether against *Schistosoma haematobium* in experimentally infected hamsters. *Int J Parasitol* 2000; 30(9): 1001-6.
- [24] Xiao SH, Booth M, Tanner M. The prophylactic effects of artemether against *Schistosoma japonicum* infections. *Parasitol Today* 2000; 16(3): 122-6.
- [25] Shuhua X, Chollet J, Weiss NA, Bergquist RN, Tanner M. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int* 2000; 49(1): 19-24.
- [26] Shalaby HA, El Namaky AH, Kamel RO. In vitro effect of artemether and triclabendazole on adult *Fasciola gigantica*. *Vet Parasitol* 2009; 160(1-2): 76-82.
- [27] Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol* 2001; 17(3): 122-6.
- [28] Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3): 233-44.