Original Article

In Vitro Study of the Effect of Artimisinin on Promastigotes and Amastigotes of *Leishmania major*

Farzad Isvand Heidari[1], Fatemeh Ghaffarifar[2*], Abdolhossein Dalimi[3], Nahid Mortazavi Dehkordi[1], Sakineh Ghasmi Nikoo[4]

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

4- M.Sc., Department of Parasitology, 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: 27/Sep/2011, Accepted: 17/Apr/2012

Abstract

Objective: Cutaneous leishmaniasis is an endemic infectious disease considered to be a crucial health problem in many countries, including Iran. As such, there is a need for new medications with few side effects. In the present research we have studied the effect of artimisinin on *Leishmania major (L. major)* and cell death in vitro.

Methods: A specific number of promastigotes of *L. major* were grown in the presence of different concentration of artimisinin to achieve IC_{50} of the drug. The MTT method was applied to evaluate the cytotoxic effect of the artiminisinin on *L. major*. Various densities of this drug were applied to study the induction of apoptosis by flow cytometry on *L. major* promastigotes.

Results: We calculated the IC_{50} of artimisinin to be 25 µg/ml by promastigote assay. Promastigotes were incubated at 72 hours incubation with various doses of artimisinin (10, 25, 50 and 100 µg/ml). The dose 100 µg/ml showed the most apoptosis (68.16%) by Annexin-V FITC. Whereas the 10 µg/ml dose had the least apoptosis (12.78%). There was no change in the control group. According to MTT, the toxic effect of artiminisinin on *L. major* promastigotes increased with increasing drug concentration.

Conclusions: This study revealed that artimisinin has a little toxic effect on macrophages. According to the flow cytometry and MTT results, artimisinin can be suggested as an appropriate drug for in vivo antileishmanial study.

Keywords: *Leishmania major*, Artimisinin, Apoptosis, Flow cytometry, In vitro

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 1, Spring 2012, Pages: 33-43

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

مقاله اصیل

بررسی اثر داروی آرتمیزینین بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

فرزاد عیسوندحیدری[1]، فاطمه غفاری‌فر[2*]، عبدالحسین دلیمی[3]، ناهید مرتضوی‌دهکردی[1]، سکینه قاسمی نیکو[4]

۱- دانش آموخته کارشناسی 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 انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی
Email: ghafarif@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۰۵ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۱/۲۸

چکیده

هدف: لیشمانیازیس جلدی یک بیماری عفونی آندمیک و از معضلات مهم بهداشتی در بسیاری از کشورها از جمله ایران است بنابراین نیاز به داروهای جدید، قابل دسترس و با عوارض کم کاملاً احساس می‌شود. به همین منظور در پژوهش حاضر تأثیر داروی آرتمیزینین بر رشد انگل لیشمانیا ماژور و مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ناشی از آن بر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: محلول استوک آرتمیزینین به‌صورت تازه با غلظت‌های مختلف دارو تهیه شد و IC_{50} دارو به‌دست آمد. برای به‌دست آوردن اثر سمیت سلولی داروی آرتمیزینین روی انگل از روش MTT استفاده شد. از غلظت‌های مختلف داروی آرتمیزینین برای بررسی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به روش فلوسایتومری روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استفاده شد.

نتایج: IC_{50} داروی آرتمیزینین ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد سلول‌ها (۶۸/۱۶) و در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کمترین درصد سلول‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی شده (۱۲/۷۸) شدند و در گروه کنترل تغییری مشاهده نشد. میزان سمیت دارو روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با افزایش غلظت دارو افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: در این بررسی مشخص شد داروی آرتمیزینین اثر سمیت کمی بر ماکروفاژ دارد. با توجه به نتایج بررسی فلوسایتومتری و روش MTT، می‌توان داروی آرتمیزینین را به‌عنوان یک داروی مناسب ضد لیشمانیایی برای انجام مطالعه در شرایط درون تنی پیشنهاد کرد.

کلیدواژگان: لیشمانیا ماژور، آرتمیزینین، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، فلوسایتومتری، شرایط آزمایشگاهی

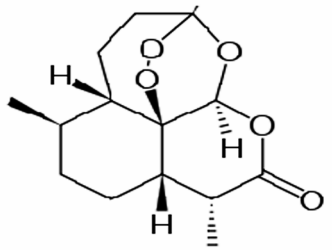
مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۳۳-۴۳

مقدمه

سازمان جهانی بهداشت بیماری لیشمانیازیس (Leishmaniasis) را در ردیف شش بیماری مهم عفونی مناطق گرمسیری دنیا معرفی کرده است. در حال حاضر ۸۸ کشور جهان

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

به انواع مختلف این بیماری آلوده هستند و تعداد موارد جدید بیماری سالیانه دو میلیون نفر تخمین زده می‌شود که از این تعداد، ۱/۵ میلیون مورد لیشمانیازیس جلدی و ۵۰۰ هزار لیشمانیازیس احشایی است. ۹۰ درصد لیشمانیازیس جلدی جهان در کشورهای افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه گزارش شده است [۱-٤]. متأسفانه تعداد مبتلایان به انواع این بیماری در جهان رو به افزایش است. در ایران لیشمانیازیس جلدی (خشک و مرطوب) از بیماری‌های مهم انگلی بوده و می‌توان گفت بعد از مالاریا (Malaria) مهم‌ترین بیماری منتقل شده توسط بندپایان است [۵]. بیماری در ایران از سال ۱۳٦۸ به بعد افزایش چشمگیری داشته به‌طوری که در سال ۱۳۷۱، میزان وفور لیشمانیازیس جلدی برابر ۹۱ مورد در صد هزار نفر رسید [۵]. داروهای رایج در درمان این بیماری [آنتیموان پنج ظرفیتی (Pentavalent Antimonials)، آمفوتریسین B (Amphotericin B) و غیره] هر یک دارای آثار جانبی و محدودیت‌های خاص خود است. به‌طور مثال داروی آنتیموان پنج ظرفیتی دارای آثار سمی زیاد، طولانی بودن مدت درمان و درد فراوان ناشی از تزریق در محل است [٦]. بنابراین مطالعه در مورد یافتن داروهای جایگزین در درمان لیشمانیازیس از اهمیت فراوانی برخوردار است. داروی آرتمیزینین (Artimisinin) به‌عنوان یک داروی ضد مالاریا استفاده می‌شود. آثار آرتمیزینین علیه گونه‌های مختلف لیشمانیا (*Leishmania*) نشان داده شده است [۷]. همچنین در مطالعه‌ای نشان داده شد که آرتمیزینین بر لیشمانیازیس جلدی مؤثر است و ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptotic Death) می‌کند [۸]. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptisis) روندی است که در آن سلول‌ها بدون ایجاد پاسخ ایمنی و التهابی از بین می‌روند. در ابتدا تصور می‌شد که پدیدهٔ مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فقط در جانداران پر سلولی اتفاق می‌افتد. اما مطالعات جدید نشان می‌دهد که در یوکاریوت‌ها نظیر لیشمانیا نیز اتفاق می‌افتد [۹]. با اثبات مرگ برنامه‌ریزی شده در تک‌یاخته‌های کینتوپلاستیده (Kinetoplastid)، مطالعات زیادی برای استفاده از ترکیبات و داروهای مختلف برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در این گروه از تک یاخته‌ها انجام شده است [۱۰]. آرتمیزینین و مشتقات آن دسته جدید و مهمی از دارروهای ضد مالاریا است که استفاده از آن‌ها به‌تدریج در سراسر جهان متداول می‌شود. همچنین مشتقات نیمه سنتزی و سنتزی آن در حال پیشرفت است. مشتقات آرتمیزینین به سرعت عمل می‌کند و به سرعت هم حذف می‌شود. یورش سریع این داروها باعث شده که آن‌ها به‌طور خاص علیه مالاریای حاد مؤثر باشند [۱۱]. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر داوی آرتمیزینین بر پروماستیگوت‌های (Promastigotes) لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) و به‌دست آوردن IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) و همچنین بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ناشی از تأثیر دارو است. در تحقیق حاضر از آرتمیزینین خالص (شکل ۱) که از برگ‌های گیاه آرتمیزیا (Artemisia) به‌دست آمده استفاده شده است.



شکل ۱ ساختار شیمیایی آرتمیزینین

مواد و روش‌ها

ابتدا داروی خالص آرتمیزیا با فرمول ($C_{15}H_{22}O_5$) و وزن مولکولی ۲۸۲/٤ به‌صورت خالص از شرکت Enzo Life Sciences (آمریکا) خریداری شد. محلول استوک آرتمیزینین به‌صورت تازه به نسبت یک به یک (وزنی/وزنی) اتانول و آب مقطر استریل تهیه شد. غلظت‌های (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از دارو تهیه شد. در بررسی حاضر از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

سویه استاندارد لیشمانیا ماژور (MR HO/HR/75/ER) که در گروه انگل‌شناسی نگهداری می‌شود، استفاده شد. برای تولید انبوه انگل از محیط RPMI1640 غنی شده به همراه ۱۰ درصد سرم گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و پنی‌سیلین G (Penicillin G) (۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (Streptomycin) (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد و در دمای۱۸ تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر ۷۲ ساعت یک‌بار پاساژ انجام شد.

سنجش فعالیت ضد پروماستیگوتی و ضد آماستیگوتی آرتمیزنین در محیط آزمایشگاهی (In vitro)

اندازه‌گیری به روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]

فعالیت ضد لیشمانیایی آرتمیزینین در ابتدا با سنجش اثر دارو روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به وسیله روش MTT اندازه‌گیری شد [۱۲]. رشد و تکثیر سلولی و آثار سمی ضد سلولی دارو توسط آزمون MTT بررسی شد. به‌طور خلاصه برای اجرای آزمون MTT از پلیت الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) استفاده شد. تعداد ۲×۱۰^{٦} پروماستیگوت در فاز لگاریتمی به همراه غلظت‌های (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از داروی آرتمیزینین به هر کدام از چاهک‌های ۹٦ خانه‌ای اضافه شد، پلیت در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد و پس از گذشت مدت زمان مذکور میزان زنده بودن پروماستیگوت‌های انگلی توسط آزمون کمی رنگ‌سنجی MTT بررسی شد. پس از ۷۲ ساعت پلیت حاوی انگل و دارو سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد سپس به هر کدام از چاهک‌ها MTT (۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد. پس از ٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد از محلول DMSO (Dimethyl Sulfoxide) برای حل کردن کریستال‌های فورمازان (Formazan) اضافه شد و پلیت به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. سپس جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) در طول موج ٥٤۰ نانومتر بررسی شد. تعداد نسبی سلول‌های زنده ارتباط مستقیمی با میزان جذب نوری نمونه دارد. درصد زنده بودن سلول‌های کنترل و سلول‌های مواجه شده با دارو با استفاده از این فرمول به‌دست آمد:

$$\text{درصد زنده ماندن} = [(A_T-A_B)/A_C-A_B)] \times ۱۰۰$$

در این فرمول A_C جذب نوری سلول‌های کنترل، A_T جذب نوری سلول‌های تحت درمان با آرتمیزینین و A_B جذب نوری چاهک بدون سلول (بلانک) است.

بررسی سمیت دارو بر ماکروفاژهای سالم به روش MTT

تعداد $۱۰^{٥}$ ماکروفاژ در هر چاهک با غلظت‌های مختلف دارو (غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای هر غلظت در هر زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت سه چاهک) مواجه شد. آزمون MTT برای نمونه‌ها انجام شد و برای محاسبه SI (Stimulation Index)، جذب به‌دست آمده برای هر نمونه بر میزان جذب به‌دست آمده از نمونه‌های کنترل (ماکروفاژ بدون دارو) تقسیم شد.

اندازه‌گیری اثر داروی آرتمیزینین بر رشد پروماستیگوت‌ها

برای به‌دست آوردن IC_{50} داروی آرتمیزینین بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور، تعداد ۳×۱۰^{٥} پروماستیگوت در میلی‌لیتر به همراه غلظت‌های مختلف داروی آرتمیزینین (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰میکرو گرم در میلی لیتر) کشت داده شد (هر غلظت ۳ بار تکرار شد). پلیت کشت را در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری و روزانه با میکروسکوپ بررسی شد. درپایان با استفاده از رسم نمودار نتایج به‌صورت IC_{50} گزارش شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

بررسی میزان مرگ سلولی لیشمانیا ماژور بـه روش فلوسایتومتری

برای افتراق سلول‌های دچار نکـروز و مـرگ برنامـه‌ریـزی شده در پروماستیگوت‌ها و ماکروفاژهای آلوده بـه آماسـتیگوت (Amastigote) مواجه شده با دوزهای مختلـف آرتمیـزینین از روش فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی آنکـسین V (Annexin-V) و پروپیدیوم آیودید (Propidium Iodide: PI) اسـتفاده شـد. در مطالعه حاضر از کیت شرکت Roche (آلمان) استفاده شد.

برای افتـراق سـلول‌هـای دچـار نکـروز و مـرگ سـلولی، پروماستیگوت‌های مواجه شده با غلظت‌هـای ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتـر داروی آرتمیـزینین و سـلول‌هـای کنترل بعد از ۷۲ ساعت در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گـراد دو بـار توسط محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) خنـک شسته شـدند و در دور ۱٤۰۰g بـه‌مـدت ۱۰ دقیقـه سـانتریفوژ شدند. طبق برنامه به سلول‌هـای رسـوب داده شـده ۱۰۰ لانـدا محلـول Annexin-V FITC (Annexin-V Fluorescein Isothiocyanate) و همچنین ۱۰۰ لاندا محلول PI اضافه شد. سوسپانسیون به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. شدت رنگ Annexin-V FITC جذب شده با سلول‌ها توسط دستگاه FACSCALIBOR بررسـی و توسط نرم‌افزار Cell quest تجزیه و تحلیل شد.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد آماستیگوت‌ها

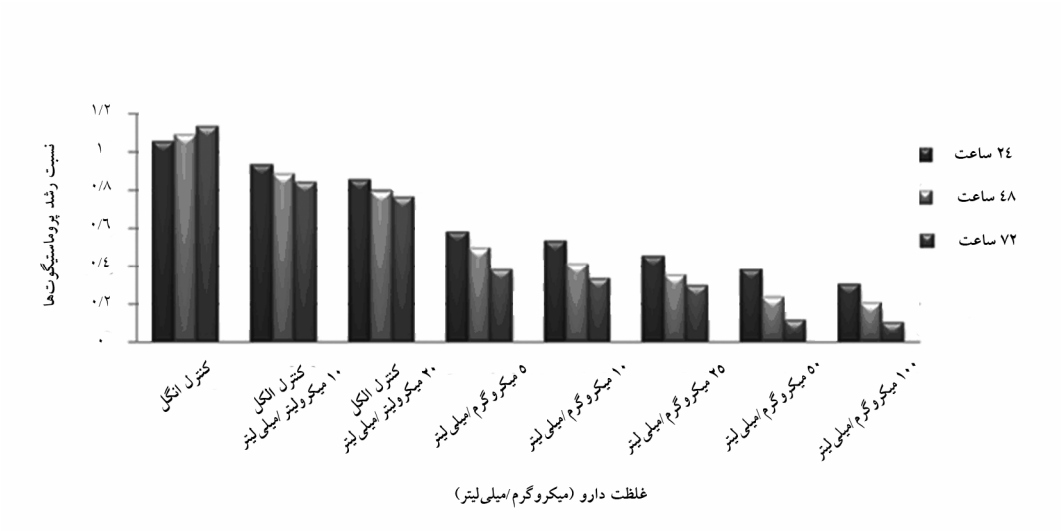
برای انجـام ایـن آزمـون تعـداد $۵×۱۰^{۷}$ پروماسـتیگوت بـه صفاق موش BALB/c تزریق شد. بعد از گذشـت ۲٤ سـاعت می‌توان از این ماکروفاژهای آلوده برای انجـام آزمـون اسـتفاده کرد. لازم به ذکر اسـت کـه بـرای ازدیـاد تعـداد ماکروفاژهـای صفاق موش از هیچ نوع ماده تحریک کننده‌ای استفاده نشد زیرا ممکن است خود این مواد روی رشـد انگـل درون ماکروفاژهـا تأثیر گذاشته و به‌عنوان یک عامل مداخله‌گر در آزمون اخـتلال ایجاد کند. بعد از انجام این مراحل موش‌های آلوده شده کـشته و ماکروفاژهای محوطه صفاقی جمـع‌آوری و در فلاسـک‌هـای استریل ٤۰ سی‌سی کشت داده شد. به دلیل خاصیت چسبندگی ماکروفاژها به ظروف شیشه‌ای و همچنین به‌منظور جـدا کـردن اضافه محیط RPMI و بقیه سـلول‌هـا بـه غیـر از ماکروفاژهـا، فلاسک‌ها برای مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. طی این مدت تمـامی ماکروفاژهـا بـه کف پلیـت چـسبیدند و بعـد از زمـان ۲٤ سـاعت فلاسـک از انکوباتور خارج و مـواد موجـود در آن، بـه جـز ماکروفاژهـای چسبیده تخلیه شد. سپس میزان ٤ میلی‌لیتر از RPMI همراه بـا ۲۰ درصد FBS بـه درون فلاسـک ریختـه شـد (تمـامی ایـن مراحل باید در زیر هود و تحت شرایط اسـتریل انجـام گیـرد). بعد از ا نجام این مراحل، فلاسک‌ها به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقـه در بین تکه‌های یخ قرار داده شد و طی این مدت فلاسک‌ها تکـان داده شد. این تکه‌های یـخ باعـث مـی‌شـود کـه ماکروفاژهـای چسبیده به کف پلیت در مایع RPMI غوطه‌ور شود. مقداری از این RPMI که حاوی ماکروفاژهای آلوده اسـت روی یـک لام قرار داده شد و خشک شد. سپس این گسترش توسـط متـانول تثبیت و با رنگ گیمسا (Giemsa) به‌صـورت لام‌هـای خـونی رنگ‌آمیزی شد. پـس از آن بقیـه ماکروفاژهـای آلـوده در کنـار غلظت‌های مختلف دارو کشت داده شد و تعداد آماستیگوت‌هـا در ماکروفاژ پـس از ۲٤، ٤۸ و ۷۲ سـاعت بـراسـاس میـانگین تعداد آن‌ها در ماکروفاژ محاسبه شد.

نتایج

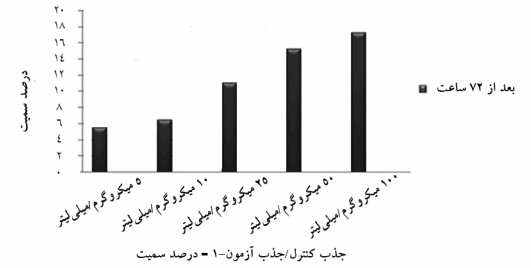
نتایج مربوط به تأثیر دارو بر پروماستیگوت‌ها به روش آزمون پروماستیگوت (Promastigote Assay)

اثر سمیت سلولی داروی آرتمیزینین بـر پروماسـتیگوت‌هـای لیشمانیا ماژور سوش (MR HO/HR/75/ER) به روش آزمـون پروماستیگوت (Promastigote Assay) میزان IC_{50} دارو برابـر با ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از ۲٤ ساعت انـدازه‌گیـری شـد (نمودار ۱).

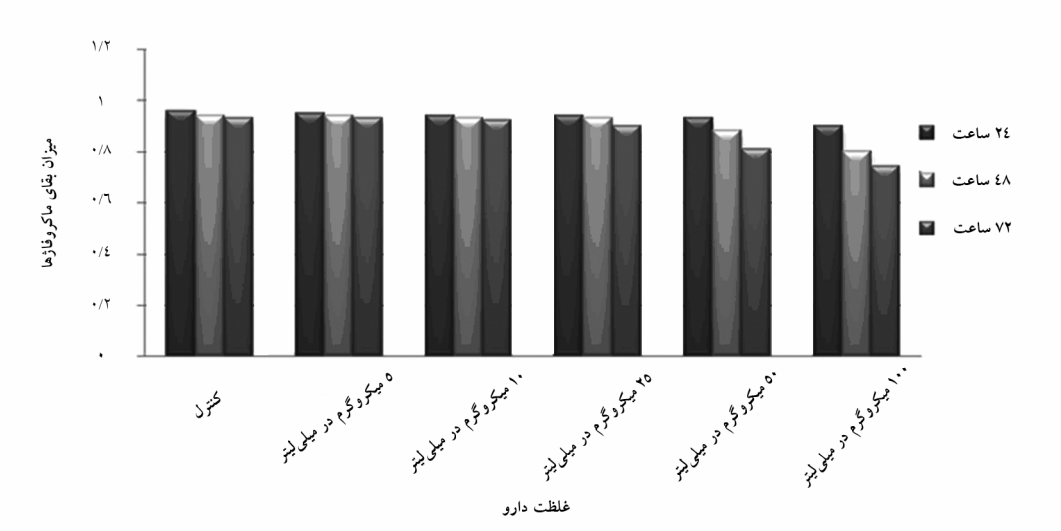
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]



نمودار ۱ نسبت رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در حضور غلظت‌های مختلف داروی آرتمیزنین در زمان‌های ۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل



نمودار ۲ مقایسه درصد سمیت بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با استفاده از روش MTT



نمودار ۳ بررسی تأثیر سمیت داروی آرتمیزینین بر ماکروفاژهای سالم بعد از ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

نتایج بررسی سمیت دارو بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با روش MTT

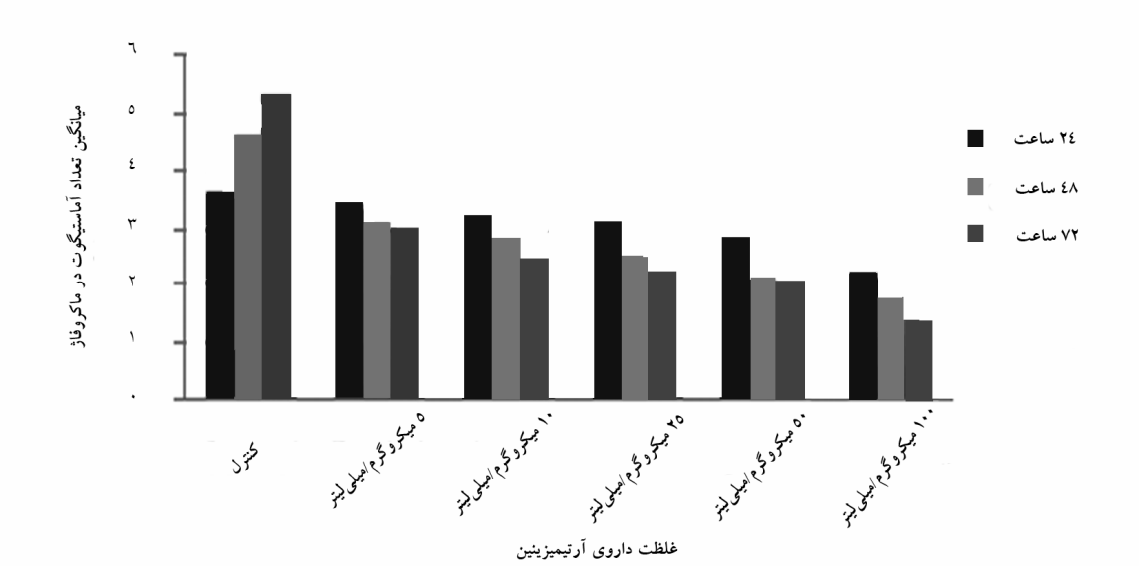
درصد سمیت دارو با غلظت‌های مختلف پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با استفاده از جذب نوری به‌دست آمده در طول موج ۵٤۰ تقسیم بر جذب نوری به‌دست آمده از گروه کنترل در نمودار ۲ آمده است.

نتایج بررسی سمیت دارو بر ماکروفاژهای سالم با روش MTT

نتایج این بررسی نشان داد که این دارو حتی در غلظت‌های بالا و تا ۷۲ ساعت اثر سمی کمی بر ماکروفاژهای سالم دارد (نمودار ۳).

نتایج بررسی تأثیر داروی آرتمیزنین بر رشد آماستیگوت‌ها

نتایج این آزمایش براساس شمارش تعداد آماستیگوت‌ها در ۱۰۰ ماکروفاژ به‌دست می‌آید و برای به‌دست آوردن متوسط تعداد آماستیگوت در هر ماکروفاژ، عدد به‌دست آمده تقسیم بر ۱۰۰ می‌شود. نتایج نشان داد که تعداد آماستیگوت‌ها در گروه کنترل در حال افزایش ولی در گروه‌های تیمار شده با دارو این تعداد کاهش می‌یابد و این کاهش وابسته به دوز و زمان است. سایر اطلاعات در نمودار ٤ آمده است.

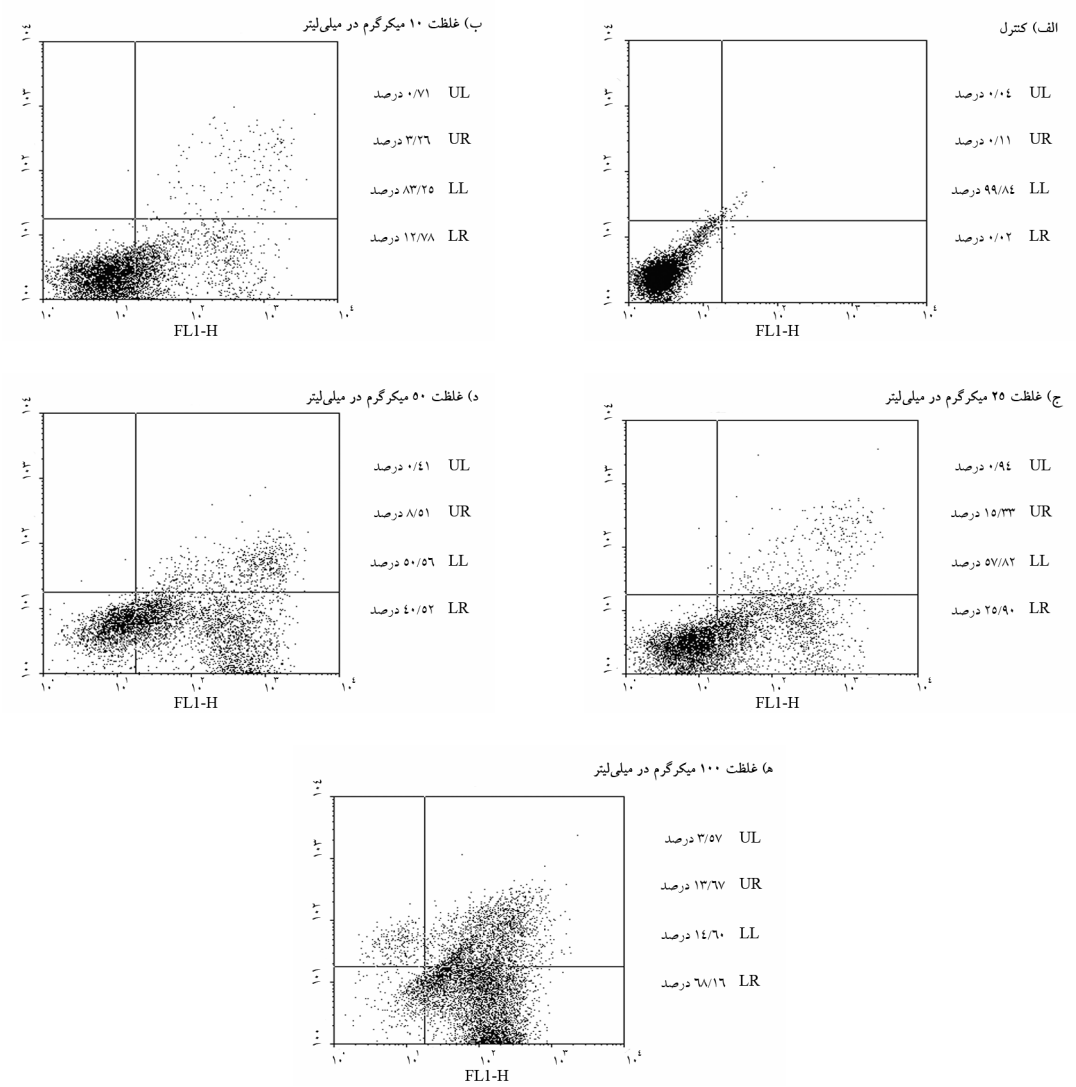


نمودار ٤ درصد ممانعت کنندگی داروی آرتمیزینین از ورود انگل به درون ماکروفاژ (آزمون آماستیگوت/ماکروفاژ)

نتایج بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با روش فلوسایتومتری

نتایج این بررسی نشان داد که بر اثر مجاورت دارو و انگل، پروماستیگوت‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شوند که درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به توجه به غلظت‌های دارویی ۱۰، ۲٥، ٥۰ و ۱۰۰ به‌ترتیب ۱۲/۷۸، ۲٥/۹۰، ٤۰/٥۲ و ٦۸/۱٦ درصد است در حالی‌که برای گروه کنترل بدون دارو ۰/۰۲ درصد است. درصد نکروز نیز به‌ترتیب ۰/۰،۷۱/۰٤، ۰/۹٤، ۰/٤۱ و ۳/٥۷ درصد محاسبه شد. سایر اطلاعات در شکل ۲ آمده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]



شکل ۲ تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری پروماستیگوت‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) داروی آرتمیزینین بعد 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 شدهٔ تأخیری)، LL (Low Left): ناحیه چپ و پایین (سلول زنده)، LR (Low Right): ناحیه راست و پایین (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی)
منطقه LR: منطقه سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده (باند شده با انکسین) و منطقه UL: منطقه سلول‌های دچار نکروز (باند شده با PI)، منطقه UR: منطقه سلول‌های باند شده با هر دو رنگ انکسین و پروپیدیوم، منطقه LL: منطقه سلول های زنده، **الف، ب، ج، د، ه)** به‌ترتیب نتایج تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری گروه کنترل (انگل بدون دارو) و گروه‌های مواجه شده با غلظت‌های (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) داروی آرتمیزینین بعد از ۷۲ ساعت

بحث

در حال حاضر در دنیا تلاش‌های زیادی برای پیدا کردن داروهای مؤثرتر برای درمان بیماری‌های انگلی به‌خصوص لیشمانیازیس در حال انجام است [۱۳]. در اغلب نقاط جهان آنتی‌موان‌های چند ظرفیتی اولین خط دفاعی برای درمان لیشمانیازیس است. همچنین آمفوتریسین B و پنتامیدین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

(Pentamidine) به عنوان روش دیگر درمان استفاده می‌شود که علاوه بر گران بودن، آثار جانبی جدی برای بیماران ایجاد می‌کند [١٤]. به‌علاوه مقاومت‌های دارویی ایجاد شده در روند درمان بیماری مشکلاتی را ایجاد کرده است؛ بنابراین نیاز مبرم به داروهای جدید وجود دارد. سمیت کم و تأثیر زیاد داروی آرتمیزینین بر مالاریا به خوبی اثبات شده است [١٥]. اثر آرتمیزینین و مشتقات آن بر بیماری مالاریا سبب شده است که سازمان بهداشت جهانی آن را به‌عنوان خط مقدم برای درمان مالاریا معرفی کند [١٦]. اثر مهار کنندگی آرتمیزینین روی مرحله اریتروسیتی، غیرجنسی انگل مالاریا است. گزارش‌هایی از آثار آرتمیزینین و مشتقات آن روی شیستوزوما مانسونی (*Schistosoma mansoni*)، شیستوزوما ژاپونیکوم (*Schistosoma japonicum*) و همچنین توکسوپلاسما گونده‌ای (*Toxoplasma gondii*) منتشر شده است [١٧]. همچنین در درمان کلونورکیس سیننسیس (*Clonorchis sinensis*) [١٧]، نگلریا فاولر (*Negleria fowleri*) [١٨] استفاده شده است. داروی آرتمیزینین بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نیز آزمایش شده که مؤثر نبوده است [١٧، ١٩]. پراکسیدها منبع شناخته شده اکسیژن فعال از قبیل رادیکال آزاد هیدروکسیل و سوپراکسید است. بر این اساس احتمالاً رادیکال‌های آزاد می‌تواند در مکانیسم عمل درگیر باشد. رادیکال‌های آزاد کربنی و اکسیژنی ایجاد شده که از نظر ساختاری با هم متفاوت هستند، در مرحله بعد به‌طور انتخابی پروتئین‌های مختلف سلول را الکیله و هیدروکسیله می‌کند و آثار سمی به جای می‌گذارد. نقش رادیکال آزاد در مکانیسم بیولوژی عمل مشتقات آرتمیزینین در اواخر دهه ١٩٨٠ اثبات شد [٢٠].

مکانیسم عمل آرتمیزنین در تشکیل پل پراکسید است بنابراین آرتمیزینین فاقد اتم اکسیژن فعال نمی‌باشد [٢١]. آرتمیزینین با آهن داخلی انگل واکنش نشان داده و رادیکال آزاد سمی تولید می‌کند و به همین دلیل آرتمیزینین برای انگل‌ها سمی است [٢٢].

به همین ترتیب انگل لیشمانیا برای رشد و تکثیر نیازمند میزان فراوانی آهن است که توسط ترانسفرین (Transferrin) وارد سلول می‌شود. حضور زیاد آهن، انگل لیشمانیا را مستعد کشته شدن توسط آرتمیزینین و دیگر مشتقات آن می‌کند.

در سال ٢٠١١ افرتا (Effertha) و همکاران IC_{50} به‌دست آمده از عصاره الکلی گیاه آرتمیزیا آنوا (*Artemisia annua*) را بر سلول‌های سرطانی بین ١٠/٨ تا ٧٧/٥ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش دادند که با نتیجه ٢٥ میکروگرم در میلی‌لیتر که در این مطالعه به‌دست آمده است همخوانی دارد [٢٣].

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه با مطالعات گذشته، داروی آرتمیزینین به‌صورت آزمایشگاهی تأثیر خوبی بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور دارد؛ همچنین باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در پروماستیگوت‌ها می‌شود. با توجه به نتایج بررسی حاضر امید است بتوان با استفاده از این دارو در درمان بیماری سالک گام‌های مؤثری برداشت.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته انگل‌شناسی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

[1] World Health Organization. Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases- leishmaniasis.2006. http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html

[2] World Health Organization. Control of leishmaniasis. Report by the secretariat. 2007. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60/A60_10-en.pdf

[3] Stratetegic Direction for Research leishmaniasis.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Feb 2002. http://www.who.int/tdr

[4] Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95(3): 239-43.

[5] Saghafipour A, Akbari A, Rasi Y, Mostafavi R. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Qom Province, Iran, during 2003-2009. Qom Univ Med Sci J 2012; 6(1): 83-8. (Persian)

[6] Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Trop 2011; 118(2): 87-96.

[7] Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. J med Microbiol 2007; 56(9): 1213-8.

[8] Yang DM, Liew FY. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. Parasitology 1993; 106 (Pt 1): 7-11.

[9] Marinho FA, Goncalves KCS, Oliveria SS, Oliviera ASC, Bellio M, d'Avila-Levy CM, Santos ALS, Branquinha MH. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106(4): 507-9.

[10] Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease Pathogenesis. India J Med Res 2006; 123(3): 233-44.

[11] Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. Int J Parasitol 2002; 32(13): 1655-60.

[12] Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. J Microbiol Methods 2006; 66(1): 79-86.

[13] Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: an overview. J Postgrad Med 2003; 49(1): 50-4.

[14] Rocha LG, Almeida JR, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 2005; 12(6-7): 514-35.

[15] Räth K, Taxis K, Walz G, Gleiter CH, Li SM, Heide L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood). Am J Trop Med Hyg 2004; 70(2): 128-32.

[16] Gordi T, Lepist EI. Artemisinin derivatives: toxic for laboratory animals, safe for humans? Toxicol Lett 2004; 147(2): 99-107.

[17] Li Y, Yu PL, Chen YX, Li LQ, Gai YZ, Wang DS, Zheng YP. [Studies on analogs of artemisinine. I. The synthesis of ethers, carboxylic esters and carbonates of dihydroartemisinine (author's transl)]. Yao Xue Xue Bao 1981; 16(6):429-39.

[18] Cooke DW, Lallinger GJ, Durack DT. In vitro sensitivity of *Naegleria fowleri* to qinghaosu and dihydroqinghaosu. J Parasitol 1987; 73(2): 411-3.

[19] Klayman DL, Lin AJ, Acton N, Scovill JP, Hoch JM, Milhous WK, Theoharides AD, Dobek AS. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. J Nat Prod 1984; 47(4): 715-7.

[20] Krungkrai SR, Yuthavong Y. The antimalarial

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81(5): 710-4.

[21] Avery MA, Gao F, Chong WK, Mehrotra S, Milhous WK. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 1. Synthesis and comparative molecular field analysis of C-9 analogs of artemisinin and 10-deoxoartemisinin. J Med Chem 1993; 36(26): 4264-75.

[22] Meshnick SR, Thomas A, Ranz A, Xu CM, Pan HZ. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. Mol Biochem Parasitol 1991; 49(2): 181-9.

[23] Efferth T, Herrmann F, Tahrani A, Wink M. Cytotoxic activity of secondary metabolites derived from *Artemisia annua* L. towards cancer cells in comparison to its designated active constituent artemisinin. Phytomedicine 2011; 18(11): 959-69.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]