

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

Farzad Isvand Heidari¹, Fatemeh Ghaffarifar^{2*}, Abdolhossein Dalimi³, Nahid Mortazavi Dehkordi¹, Sakineh Ghasmi Nikoo⁴

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: ghaffarifar@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 artemisinin 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 artemisinin to achieve IC₅₀ of the drug. The MTT method was applied to evaluate the cytotoxic effect of the artemisinin 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 IC₅₀ of artemisinin to be 25 µg/ml by promastigote assay. Promastigotes were incubated at 72 hours incubation with various doses of artemisinin (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 artemisinin on *L. major* promastigotes increased with increasing drug concentration.

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

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

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

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

فرزاد عیسوندحیدری^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، عبدالحسین دلیمی^۳، ناهید مرتضوی دهکردی^۱، سکینه قاسمی نیکو^۴

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: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی
Email: ghafarif@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۱/۲۸

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۰۵

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 به صورت تازه با غلظت‌های مختلف دارو تهیه شد و IC_{50} دارو به دست آمد. برای به دست 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 فلوسایتومتری روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور استفاده شد.

نتایج: IC_{50} داروی آرتمیزینین ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد سلول‌ها (۶۷/۱۶) 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 به عنوان 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: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۳۳-۴۳

مقدمه

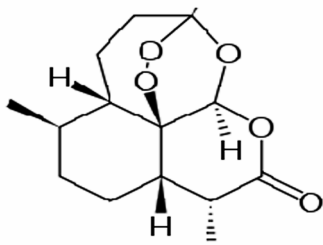
(Leishmaniasis) را در ردیف شش بیماری مهم عفونی مناطق

گرمسیری دنیا معرفی کرده است. در حال حاضر ۸۸ کشور جهان

سازمان جهانی بهداشت بیماری لیشمانیازیس

اثر آرتیمیزینین بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در این گروه از تک یاخته‌ها انجام شده است [۱۰]. آرتیمیزینین و مشتقات آن دسته جدید و مهمی از داروهای ضد مالاریا است که استفاده از آن‌ها به تدریج در سراسر جهان متداول می‌شود. همچنین مشتقات نیمه سنتزی و سنتزی آن در حال پیشرفت است. مشتقات آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین بر پروماستیگوت‌های (*Promastigotes*) لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) و به دست آوردن IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) و همچنین بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ناشی از تأثیر دارو است. در تحقیق حاضر از آرتیمیزینین خالص (شکل ۱) که از برگ‌های گیاه آرتیمیزیا (*Artemisia*) به دست آمده استفاده شده است.



شکل ۱ ساختار شیمیایی آرتیمیزینین

مواد و روش‌ها

ابتدا داروی خالص آرتیمیزیا با فرمول ($C_{15}H_{22}O_5$) و وزن مولکولی ۲۸۲/۴ به صورت خالص از شرکت Enzo Life Sciences (آمریکا) خریداری شد. محلول استوک آرتیمیزینین به صورت 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

به انواع مختلف این بیماری آلوده هستند و تعداد موارد جدید بیماری سالانه 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 [۱-۴]. 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 ۱۳۶۸ به بعد افزایش چشمگیری داشته به طوری 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 [۶]. بنابراین مطالعه در مورد یافتن داروهای جایگزین در درمان لیشمانیازیس از اهمیت فراوانی برخوردار است. داروی آرتیمیزینین (*Artemisinin*) به عنوان یک داروی ضد مالاریا استفاده می‌شود. آثار آرتیمیزینین علیه گونه‌های مختلف لیشمانیا (*Leishmania*) نشان داده شده است [۷]. همچنین در مطالعه‌ای نشان داده شد که آرتیمیزینین بر لیشمانیازیس جلدی مؤثر است و ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (*Apoptotic Death*) می‌کند [۸]. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (*Apoptosis*) روندی است که در آن سلول‌ها بدون ایجاد پاسخ ایمنی و التهابی از بین می‌روند. در ابتدا تصور می‌شد که پدیده 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 کیتوپلاستیده (*Kinetoplastid*)، مطالعات زیادی برای استفاده از ترکیبات و داروهای مختلف

کریستال‌های فورمازان (Formazan) اضافه شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. سپس جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) در طول موج ۵۴۰ 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 به دست آمد:

$$100 \times [(A_T - A_B) / (A_C - A_B)] = \text{درصد زنده ماندن}$$

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

بررسی سمیت دارو بر ماکروفاژهای سالم به روش

MTT

تعداد 10^6 ماکروفاژ در هر چاهک با غلظت‌های مختلف دارو (غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای هر غلظت در هر زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سه چاهک) مواجه شد. آزمون MTT برای نمونه‌ها انجام شد و برای محاسبه SI (Stimulation Index)، جذب به دست آمده برای هر نمونه بر میزان جذب به دست آمده از نمونه‌های کنترل (ماکروفاژ بدون دارو) تقسیم شد.

اندازه‌گیری اثر داروی آرتیمیزین بر رشد

پروماستیگوت‌ها

برای به دست آوردن IC_{50} داروی آرتیمیزین بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور، تعداد 3×10^6 پروماستیگوت در میلی‌لیتر به همراه غلظت‌های مختلف داروی آرتیمیزین (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شد (هر غلظت ۳ بار تکرار شد). پلیت کشت را در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری و روزانه با میکروسکوپ بررسی شد. در پایان با استفاده از رسم نمودار نتایج به صورت IC_{50} گزارش شد.

سویه استاندارد لیثمانیا 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 دمای ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر ۷۲ ساعت یک‌بار پاساژ انجام شد.

سنجش فعالیت ضد پروماستیگوتی و ضد

آماستیگوتی آرتیمیزین در محیط آزمایشگاهی

(In vitro)

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

[2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

فعالیت ضد لیثمانیایی آرتیمیزین در ابتدا با سنجش اثر دارو روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا 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 2×10^6 پروماستیگوت در فاز لگاریتمی به همراه غلظت‌های (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از داروی آرتیمیزین به هر کدام از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شد، پلیت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد از محلول (Dimethyl Sulfoxide) DMSO برای حل کردن

اثر آرتمی‌زینین بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

و ماکروفاژهای محوطه صفاقی جمع‌آوری و در فلاسک‌های استریل ۴۰ سی‌سی کشت داده شد. به دلیل خاصیت چسبندگی ماکروفاژها به ظروف شیشه‌ای و همچنین به منظور جدا کردن اضافه محیط RPMI و بقیه سلول‌ها به غیر از ماکروفاژها، فلاسک‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. طی این مدت تمامی ماکروفاژها به کف پلیت چسبیدند و بعد از زمان ۲۴ ساعت فلاسک از انکوباتور خارج و مواد موجود در آن، به جز ماکروفاژهای چسبیده تخلیه شد. سپس میزان ۴ میلی‌لیتر از RPMI همراه با ۲۰ درصد FBS به درون فلاسک ریخته شد (تمامی این مراحل باید در زیر هود و تحت شرایط استریل انجام گیرد). بعد از انجام این مراحل، فلاسک‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در بین تکه‌های یخ قرار داده شد و طی این مدت فلاسک‌ها تکان داده شد. این تکه‌های یخ باعث می‌شود که ماکروفاژهای چسبیده به کف پلیت در مایع RPMI غوطه‌ور شود. مقداری از این RPMI که حاوی ماکروفاژهای آلوده است روی یک لام قرار داده شد و خشک شد. سپس این گسترش توسط متانول تثبیت و با رنگ گیمسا (Giemsa) به صورت لام‌های خونی رنگ‌آمیزی شد. پس از آن بقیه ماکروفاژهای آلوده در کنار غلظت‌های مختلف دارو کشت داده شد و تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژ پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت براساس میانگین 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 بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سوش (MR HO/HR/75/ER) به روش آزمون پروماستیگوت (Promastigote Assay) میزان IC_{50} دارو برابر با ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد (نمودار ۱).

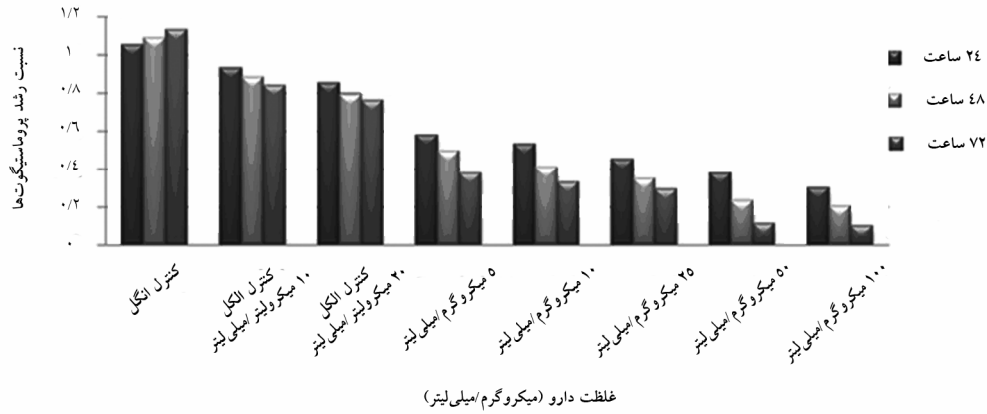
بررسی میزان مرگ سلولی لیشمانیا ماژور به روش

فلوسایتومتري

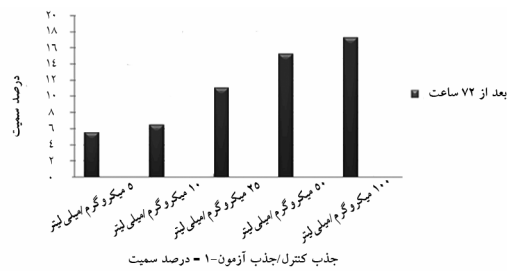
برای افتراق سلول‌های دچار نکروز و مرگ برنامه‌ریزی شده در پروماستیگوت‌ها و ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت (Amastigote) مواجه شده با دوزهای مختلف آرتمی‌زینین از روش فلوسایتومتري و رنگ‌آمیزی آنکسین V (Annexin-V) و پروپیدیوم آیودیید (Propidium Iodide: PI) استفاده شد. در مطالعه حاضر از کیت شرکت Roche (آلمان) استفاده شد. برای افتراق سلول‌های دچار نکروز و مرگ سلولی، پروماستیگوت‌های مواجه شده با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داروی آرتمی‌زینین و سلول‌های کنترل بعد از ۷۲ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد دو بار توسط محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) خنک شسته شدند و در دور ۱۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. طبق برنامه به سلول‌های رسوب داده شده ۱۰۰ لاندا محلول Annexin-V FITC (Annexin-V Fluorescein Isothiocyanate) و همچنین ۱۰۰ لاندا محلول PI اضافه شد. سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. شدت رنگ Annexin-V FITC جذب شده با سلول‌ها توسط دستگاه FACSCALIBOR بررسی و توسط نرم‌افزار Cell quest تجزیه و تحلیل شد.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد آماستیگوت‌ها

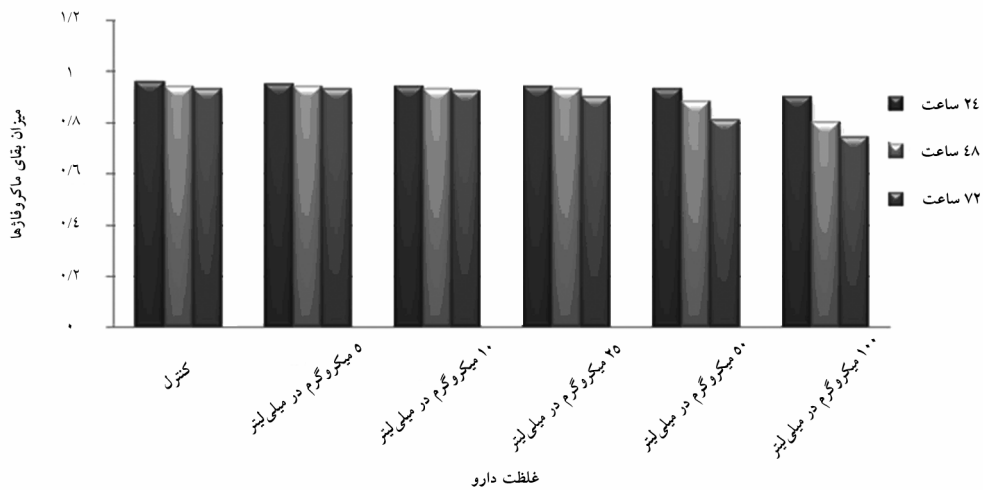
برای انجام این آزمون تعداد 5×10^7 پروماستیگوت به صفاق موش BALB/c تزریق شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت می‌توان از این ماکروفاژهای آلوده برای انجام آزمون استفاده کرد. لازم به ذکر است که برای ازدیاد تعداد ماکروفاژهای صفاق موش از هیچ نوع ماده تحریک کننده‌ای استفاده نشد زیرا ممکن است خود این مواد روی رشد انگل درون ماکروفاژها تأثیر گذاشته و به عنوان یک عامل مداخله‌گر در آزمون اختلال ایجاد کند. بعد از انجام این مراحل موش‌های آلوده شده کشته



نمودار ۱ نسبت رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در حضور غلظت‌های مختلف داروی آرتیمیزین در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل



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



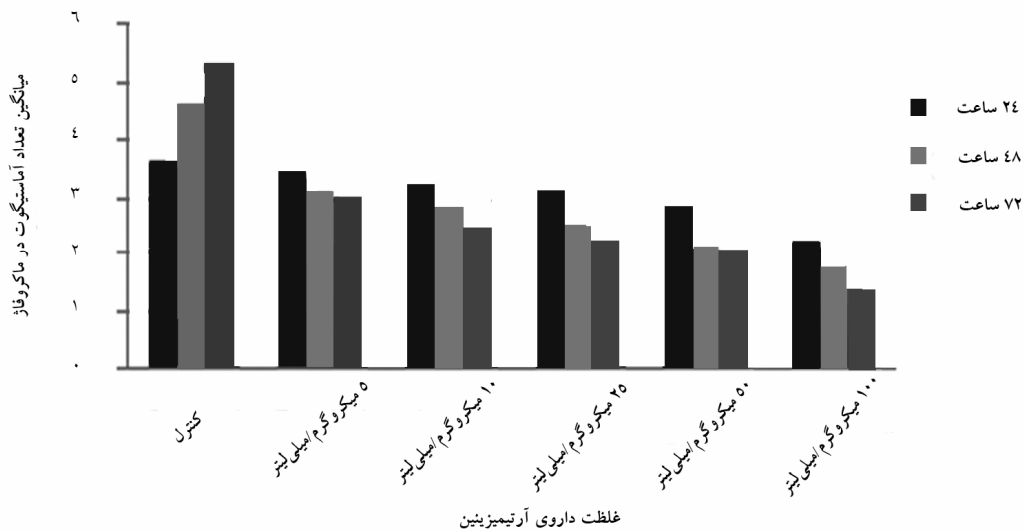
نمودار ۳ بررسی تأثیر سمیت داروی آرتیمیزین بر ماکروفاژهای سالم بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

اثر آرتیمیزین بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

(نمودار ۳).

نتایج بررسی تأثیر داروی آرتیمیزین بر رشد آماستیگوت‌ها

نتایج این آزمایش براساس شمارش تعداد آماستیگوت‌ها در ۱۰۰ ماکروفاز به دست می‌آید و برای به دست آوردن متوسط تعداد آماستیگوت در هر ماکروفاز، عدد به دست 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 ۴ آمده است.



نمودار ۴ درصد ممانعت کنندگی داروی آرتیمیزین از ورود انگل به درون ماکروفاز (آزمون آماستیگوت/ماکروفاز)

درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به توجه به غلظت‌های دارویی ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ به ترتیب ۱۲/۷۸، ۲۵/۹۰، ۴۰/۵۲ و ۶۷/۱۶ درصد است در حالی که برای گروه کنترل بدون دارو ۰/۰۲ درصد است. درصد نکروز نیز به ترتیب ۰/۰۷۱/۰۴، ۰/۰۹۴، ۰/۴۱ و ۳/۵۷ درصد محاسبه شد. سایر اطلاعات در شکل ۲ آمده است.

نتایج بررسی سمیت دارو بر پروماستیگوت‌های

لیثمانیا ماژور با روش MTT

درصد سمیت دارو با غلظت‌های مختلف پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور با استفاده از جذب نوری به دست آمده در طول موج ۵۴۰ تقسیم بر جذب نوری به دست آمده از گروه کنترل در نمودار ۲ آمده است.

نتایج بررسی سمیت دارو بر ماکروفاژهای سالم

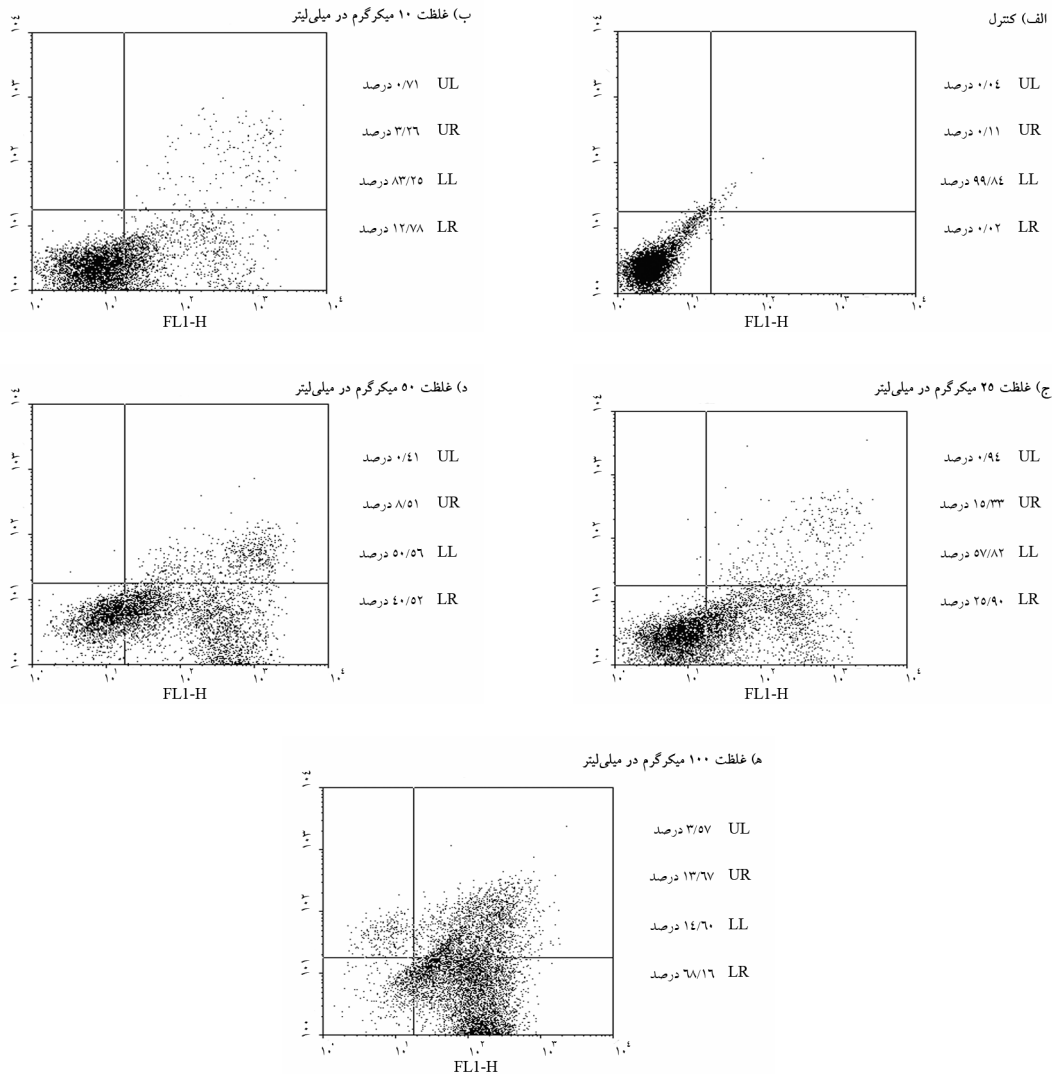
با روش MTT

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

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



شکل ۲ تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری پروماستیگوت‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) داروی آرتیمیزینین بعد از ۷۲ ساعت، محور X مربوط به آنکسین ۷ 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) منطقه LR: منطقه سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده (باند شده با آنکسین) و منطقه UL: منطقه سلول‌های دچار نکروز (باند شده با PI)، منطقه UR: منطقه سلول‌های باند شده با هر دو رنگ آنکسین و پروپیدیوم، منطقه LL: منطقه سلول‌های زنده، الف، ب، ج، د، ه) به ترتیب نتایج تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری گروه کنترل (انگل بدون دارو) و گروه‌های مواجه شده با غلظت‌های (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) داروی آرتیمیزینین بعد از ۷۲ ساعت

بحث

لیشمانیازیس در حال انجام است [۱۳]. در اغلب نقاط جهان آنتی‌موان‌های چند ظرفیتی اولین خط دفاعی برای درمان لیشمانیازیس است. همچنین آفوتریسین B و پنتامیدین

در حال حاضر در دنیا تلاش‌های زیادی برای پیدا کردن داروهای مؤثرتر برای درمان بیماری‌های انگلی به‌خصوص

اثر آرتمیزینین بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

مکانیسم عمل آرتمیزینین در تشکیل پل پراکسید است بنابراین آرتمیزینین فاقد اتم اکسیژن فعال نمی‌باشد [۲۱]. آرتمیزینین با آهن داخلی انگل واکنش نشان داده و رادیکال آزاد سمی تولید می‌کند و به همین دلیل آرتمیزینین برای انگل‌ها سمی است [۲۲].

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 ۲۰۱۱ افرتا (Effertha) و همکاران IC₅₀ به دست آمده از عصاره الکلی گیاه آرتمیزیا آنوا (*Artemisia annua*) را بر سلول‌های سرطانی بین ۱۰/۸ تا ۷۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش دادند که با نتیجه ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر که در این مطالعه به دست آمده است همخوانی دارد [۲۳].

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه با مطالعات گذشته، داروی آرتمیزینین به صورت 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.

(Pentamidine) به عنوان روش دیگر درمان استفاده می‌شود که علاوه بر گران بودن، آثار جانبی جدی برای بیماران ایجاد می‌کند [۱۴]. به علاوه 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 [۱۵]. اثر آرتمیزینین و مشتقات آن بر بیماری مالاریا سبب شده است که سازمان بهداشت جهانی آن را به عنوان خط مقدم برای درمان مالاریا معرفی کند [۱۶]. اثر مهارکنندگی آرتمیزینین روی مرحله ایتروسیتی، غیرجنسی انگل مالاریا است. گزارش‌هایی از آثار آرتمیزینین و مشتقات آن روی شیسستوزوما مانسونی (*Schistosoma mansoni*)، شیسستوزوما ژاپونیکوم (*Toxoplasma japonicum*) و همچنین توکسوپلازما گونده‌ای (*gondii*) منتشر شده است [۱۷]. همچنین در درمان کلونورکیس سیننسیس (*Clonorchis sinensis*) [۱۷]، نگلریا فاولر (*Negleria fowleri*) [۱۸] استفاده شده است. داروی آرتمیزینین بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نیز آزمایش شده که مؤثر نبوده است [۱۷، ۱۹]. 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 به طور 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 ۱۹۸۰ اثبات شد [۲۰].

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.

- 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] Râth 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 artemisinin. I. The synthesis of ethers, carboxylic esters and carbonates of dihydroartemisinin (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

اثر آرتیمیزینین بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

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 hemozoin 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.