پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۸۹ خرداد سال ۱۳۹۱ (۴۰-۳۲)

القای آپوپتوز توسط کانتاریدین در پروماستیگوت‌ها و ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

یحیی معروفی[۱]
فاطمه غفاری‌فر[۲]
عبدالحسین دلیمی[۲]
زهره شریفی[۳]
زهیر حسن[۴]

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیا تک یاخته‌ایی تاژکدار عامل لیشمانیوزیس است و مشکل عمده سلامت در بسیاری از کشورها، به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه است. کانتاریدین ترکیبی ترپنوئیدی است که در سوسک‌های خانواده Meloidae و Oedomeridae وجود دارد و ماده‌ایی تاول زاست که درسلول‌های سرطانی، مرگ برنامه‌ریزی شده را القاء می‌کند. این مطالعه جهت تعیین اثرکانتاریدین در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در پروماستیگوت و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی اثر کانتاریدین با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بر پروماستیگوت لیشمانیا ماژور و غلظت‌های ۵۰ و ۲۰، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بر ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با فلوسایتومتری بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کانتاریدین با غلظت ۵۰ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دی متیل سولفوک ید (Dimethy1 sulfoxid: DMSO) پس از ۷۲ ساعت در پروماستیگوت‌ها به‌ترتیب ۶۸/۵ درصد کشندگی (۶۳/۲۳ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۵/۲۷ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و صفر درصد نکروز) و ۱۴/۲۹ درصد کشندگی (۱۳/۱۲ مرگ برنامه‌ریزی شده، ۱/۱۲ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۰/۰۵ درصد نکروز) می‌دهد. میزان کشندگی کانتاریدین ۵۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بر ماکروفاژ آلوده پس از گذشت ۴۸ ساعت به‌ترتیب ۶۱/۸۱ درصد (۴۳/۴۲ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۱/۲۷ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۱۷/۱۱ درصد نکروز) و ۴۴/۴۴ درصد (۳۱/۰۵ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۱۰/۰۸ درصد نکروز و ۳/۳۱ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری) بود. همچنین میزان کشندگی کانتاریدین ۵۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بر ماکروفاژ غیرآلوده پس از گذشت ۴۸ ساعت به‌ترتیب ۴۹/۳۴ درصد (۲۱/۳۵ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۴/۲۳ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۲۳/۷۶ درصد نکروز) و ۴۳/۷۹ درصد (۳۴/۹ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۷/۲۷ درصد نکروز و ۱/۶۱ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری) بود.

استنتاج: نتایج نشان داد که کانتاریدین در زمان و غلظت های متفاوت باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، فلوسایتومتری، کانتاریدین، لیشمانیا ماژور

مقدمه

لیشمانیا جزو تک یاختگان تاژکدار و عامل بیماری لیشمانیوزیس است. لیشمانیوزیس (leishmaniosis) به سه شکل جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی وجود دارد. حدود ۱۲ میلیون نفر در ۸۸ کشور دنیا به لیشمانیازیس

مولف مسئول: فاطمه غفاری فر- تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی E-mail: ghafarif@modares.ac.ir
۱. دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. گروه ویروس‌شناسی، سازمان انتقال خون
۴. گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت : ۹۰/۱۱/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۱/۱/۲۰ تاریخ تصویب : ۹۱/۳/۲

Archive of SID
www.SID.ir

مبتلا بوده و سالانه دو میلیون مورد جدید بیماری نیز گزارش می‌شود(۲،۱). در ایران سالانه بیش از ۳۰ مورد درصد هزار نفر رخ می‌دهد(۳). در لیشمانیوزیس جلدی، در محل نیش پشه، زخمی به‌وجود می‌آید که از چند ماه تا یک سال باقی خواهد ماند. درمان لیشمانیوزیس با ترکیبات آنتی‌موآن (Antimonial compounds)، شامل استیبوگلوکونات سدیم (Sodium stibogluconate) و آنتی موآن مگلومین (Meglumine antimonate) انجام می شود. علاوه بر عوارض این داروها، احتمال عود بیماری نیز وجود دارد(۲،۱).

کانتاریدین اولین بار در سال ۱۸۱۰ توسط روبیکت (Robiquet) در سوسک Lytta vesicaoria شناسایی و نام‌گذاری گردید(۴). کانتاریدین (Cantharidin) از کلمه یونانی Kantharos به‌معنی سوسک است. کانتاریدین جزو ترکیبات ترپنوئیدی و در هموئلف سوسک‌های خانواده Meloidae و Oedomeridae وجود دارد، ترکیبی بی‌رنگ و بی‌بو که در حلال‌های آلی حل می‌شود. نام شیمیایی آن 2,6-Dimethyl-4,10-dioxatricyclo-decane-3,5-dione می‌باشد. دمای ذوب آن ۲۱۸ درجه سانتی‌گراد و پایدار در محیط است. کانتاریدین ماده‌ایی تاول‌زا است که به سوسک‌های میلوئیده، سوسک‌های تاول‌زا هم گفته می‌شود(۵). کانتاریدین حدود ۲۰۰۰ سال پیش در چین به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گرفته و صد سال پیش، از آن برای درمان زگیل استفاده می‌شد(۶). حکیم جرجانی چگونگی استفاده از سوسک تاول‌زا (ذراریح) را برای درمان زگیل، پیسی، ریزش مو، درمان هاری، ورم شکم و سیاه شدن ناخن شرح داده است(۷). احشام خصوصاً اسب از طریق خوردن یونجه آلوده به کانتاریدین مسموم می‌شوند. مقدار ۰/۴۵ میکروگرم در هر کیلوگرم کانتاریدین برای اسب کشنده است(۵). همچنین مواردی از مسمومیت انسان در اثر خوردن سوسک تاول‌زا گزارش شده است(۸). کانتاریدین به دلیل خاصیت دارویی و همچنین مسمویت شدید در احشام اهمیت پزشکی و اقتصادی دارد(۹).

کانتاریدین از چند طریق بر سلول‌ها اثر می‌گذارد؛ I) مهار پروتئین فسفاتاز ۱ و ۲ (protein phosphatase 1, 2: PP1A, PP2A)، پروتئین فسفاتازها از طریق فسفریلاسیون- دفسفریلاسیون در عملکردهای مختلف سلولی نقش دارند و هدایت سیگنال‌های وابسته به فسفریلاسیون را بر عهده دارند، همچنین محل اتصال بسیاری از سموم طبیعی هستند. از طریق تعیین توالی اسیدهای آمینه، پروتئین متصل شونده به کانتاریدین (Cantharidin-binding protein: CBP)، به‌عنوان پروتئین فسفاتاز معرفی شد(۱۰). کانتاریدین فسفریلاسیون پروتئین‌های تنظیمی را افزایش می‌دهد (۴، ۱۳-۱۱). II) فعال کردن مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis)، کانتاریدین باعث افزایش کاسپاز ۳ (Caspase 3) شده و همزمان Bcl 2 که پروتئین ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است را کاهش می‌دهد(۱۴،۱۳). کانتاریدین کاسپاز ۸ و ۹ را نیز افزایش داده و تمام مهار کننده‌های کاسپاز را بلوکه می‌کند. همچنین مانع فسفریلاسیون STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) می‌شود، STAT3 رونویسی ژن bcl-xl را فعال می‌کند(۱۵). برخی از مطالعات نشان می‌دهد که کانتاریدین از مسیر p53 باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود(۱۹-۱۶). III) وقفه در چرخه سلولی در مرحله G2/M، کانتاریدین از طریق تشکیل دوک‌های غیرعادی تقسیم و تأخیر در تشکیل کروموزوم‌ها باعث توقف سلول در حال تکثیر، در مرحله میتوز می‌شود(۲۰،۴). آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، شامل تغییراتی از جمله چروکیدگی سلول، تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و متلاشی شدن هسته، جابه‌جایی فسفاتیدل سرین از سطح داخلی غشای سلول به سطح خارجی آن و همچنین فعال شدن پروتئین‌هایی به‌نام کاسپازها است(۲۰). هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر کانتاریدین در ایجاد

Archive of SID
www.SID.ir

مـرگ برنامـه‌ریـزی شـده سـلولی در لیـشمانیا مـاژور (Leishmania major) و ماکروفـاژ آلـوده بـه لیـشمانیا ماژور بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است. گروه کنتـرل شـامل پروماسـتیگوت هـای لیـشمانیا مـاژور، ماکروفاژ غیرآلوده و ماکروفاژ آلوده بـه لیـشمانیا مـاژور بـدون کانتاریـدین و گـروه تجربـی شـامل گـروه هـای پروماسـتیگوت لیـشمانیا مـاژور، ماکروفـاژ غیرآلـوده و ماکروفـاژ آلـوده بـه لیـشمانیا مـاژور بـه همـراه دوزهـای مختلف کانتاریدین بوده‌اند.

کشت انگل

لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از مؤسسه رازی تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال شده (شرکت Gibco: انگلستان) در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد کشت داده شد.

تهیه غلظت‌های کانتاریدین

کانتاریدین از شـرکت Sigma خریـداری شـد و بـا غلظت ۲۰ درصد در ۱ میلی لیتر دی متیـل سولفوکـساید Dimethyl sulfoxide: DMSO به صورت محلول استوک، تهیه شد، که قابل نگهداری در یخچال بود. غلظـت‌هـای ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگـرم در میلـی‌لیتـر از استوک با استفاده از محیط کـشت RPMI 1640 تهیـه و در یخچال نگهداری شد(۲۱).

کشت ماکروفاژهای صفاقی موش و آلوده کردن آن‌ها

برای جداسازی ماکروفاژهای صفاق موش ۳ میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل به صفاق موش Balb/c تزریق شد و دوباره مایع صفاقی کشیده شـد. سپس با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیـد و ۲ بـار بـا PBS سـرد شستـشو داده شـدند(۲۲). سپس تعداد 10^5 ماکروفاژ در میلی لیتر شـمارش شـد و در پلیت کشت ۹۶ خانه‌ایی به‌همراه محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰۰ واحد به ازای هر میلی لیتر پنـی‌سـیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و سرم جنین گـاوی ۱۰ درصد کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گـراد و CO2 ۵ درصـد گذاشـته شـد. بـرای آلـوده کـردن ماکروفاژها تعـداد 10^6 پروماسـتیگوت (Promastigote) انگل در میلی‌لیتر در مرحله ایستایی (Stationary) شمارش و بـه چاهـک حـاوی ماکروفـاژ افـزوده شـد. پـس از ۶ ساعت برای حذف ماکروفاژهای نچسبیده به ته چاهـک و پروماسـتیگوت وارد نـشده بـه درون ماکروفـاژ، مـایع رویی چاهک دور ریخته و محیط کـشت تـازه حـاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد به چاهک‌ها اضافه گردید.

افزودن کانتاریدین به چاهک‌ها

تعداد 10^6 پروماسـتیگوت لیـشمانیا در میلـی‌لیتـر در مرحله لگاریتمی رشد، توسط لام نئوبار شمارش گردیـد و در پلیت کشت ۲۴ خانـه‌ایـی بـه همـراه محـیط کـشت RPMI 1640 با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کـشت داده شد(۲۳،۲۱). کانتاریـدین بـا غلظـت نهـایی ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلـی لیتـر بـه چاهـک‌هـای حـاوی پروماسـتیگوت انگـل و بـا غلظـت ۵، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به ماکروفاژهای آلوده به انگل و ماکروفاژهای غیرآلوده اضافه شد. هر نمونـه بـه صـورت سه بار تکرار گذاشته شد.

فلوسایتومتری بـرای بررسـی مـرگ برنامـه ریـزی شـده سلولی در نمونه‌ها

برای انجام فلوسایتومتری از کیت Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioVision; USA) استفاده شـد و نمونـه هـا پـس از زمـان‌هـای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ سـاعت جمع آوری و هم چنین ماکروفاژهای آلوده به انگل پس از گذشـت ۲۴ و ۴۸ سـاعت جمـع آوری شـدند. بـرای جمع آوری ماکروفاژها از ترپسین ۰/۱ درصد با EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) ۰/۲ درصـد

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد(۲۲). نمونه جمع آوری شده در میکروتیوب، با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بر طبق دستورالعمل کیت، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ (Binding)، ۵ میکرولیتر آنکسین (Annexin V) و ۵ میکرولیتر پروپیدیوم یداید (Propidium iodide) اضافه و میکروتیوب به آرامی تکان داده و به مدت ۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه نگهداری و سپس با دستگاه FACSCalibur بررسی شدند. فسفاتیدیل سرین (phosphatidyl serine: PS) بر سطح خارجی غشای سلول در حال مرگ برنامه ریزی شده ظاهر می شود. فسفاتیدیل سرین گیرنده ایی برای آنکسین V است، بنابراین سلول در مرحله مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ اولیه و تأخیری برای آنکسین مثبت می‌شوند. پروپیدیوم یداید (PI) به DNA سلول متصل و چون قادر به ورود به سلول با غشای سالم نیست، تنها در سلول‌هایی که غشای آن‌ها متلاشی و یا در حال متلاشی شدن هستند، مثبت می شود. سلول زنده فاقد PS در سطح خارجی غشای خود هستند و PI هم قادر به عبور از غشا نیست، بنابراین سلول زنده، هم برای آنکسین و هم برای PI منفی محسوب می‌شوند.

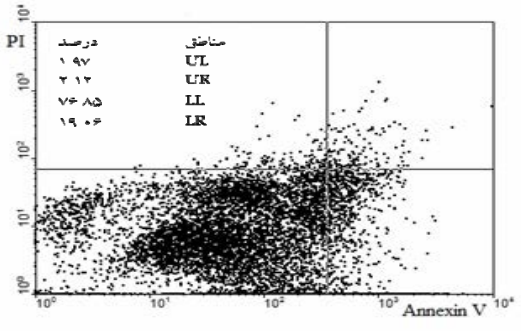
تجزیه و تحلیل داده‌ها و نتایج فلوسایتومتری

رسم تصاویر مربوط به داده‌های فلوسایتومتری و محاسبه میانگین مرگ سلولی نمونه‌ها به صورت درصدی، با استفاده از نرم افزار CellQuest صورت گرفت.

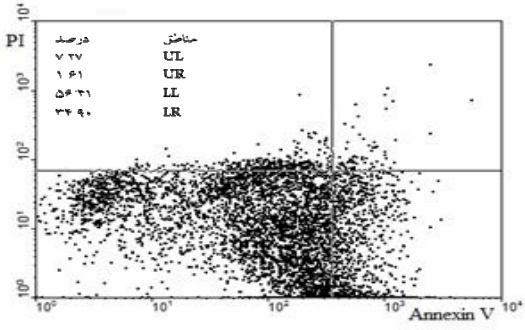
یافته‌ها

نتایج فلوسایتومتری برای ماکروفاژهای غیرآلوده پس از مواجه با کانتاریدین ۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر DMSO و گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب به صورت ۴۳/۷۹ درصد کشندگی (به‌صورت ۳۴/۹ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۷/۲۷ درصد نکروز و ۱/۶۱ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری) و ۴۹/۳۴ درصد کشندگی (۲۱/۳۵ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۴/۲۳ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۲۳/۷۶ درصد نکروز) بود (تصویر شماره ۱).

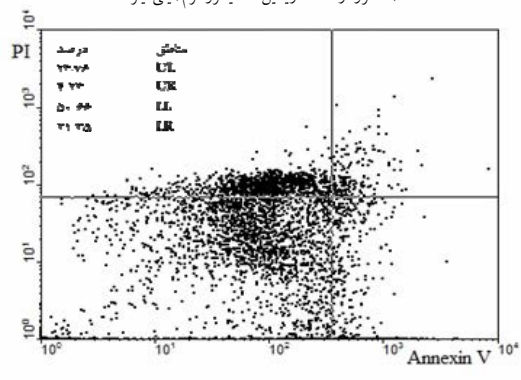
۱) ماکروفاژ (کنترل)



۲) ماکروفاژ + کانتاریدین ۵ میکروگرم/میلی لیتر



۳) ماکروفاژ + کانتاریدین ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر



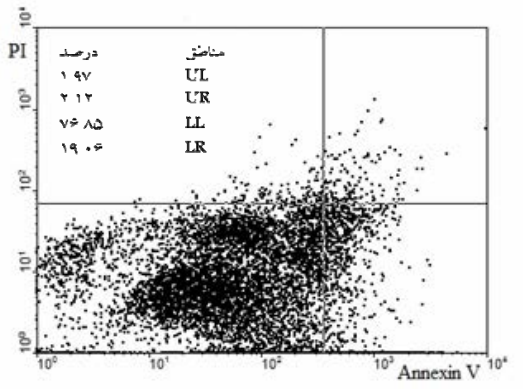
تصویر شماره ۱: نتایج فلوسایتومتری در ماکروفاژهای غیرآلوده با استفاده از نرم افزار CellQuest؛ ۱) نمونه کنترل پس از ۴۸ ساعت، ۲) ماکروفاژ مواجه شده با کانتاریدین ۵ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت، ۳) ماکروفاژ مواجه شده با کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت، محور x مربوط به آنکسین v و محور y مربوط به پروپیدیوم یداید است.
UL (Upper Left) ناحیه چپ و بالا (نکروز)، UR (Upper Right) ناحیه راست و بالا (مرگ برنامه ریزی شدهٔ تأخیری)، LL (Low Left) ناحیه چپ و پایین (سلول زنده)، LR (Low Right) ناحیه راست و پایین (مرگ برنامه ریزی شده سلولی).

www.SID.ir

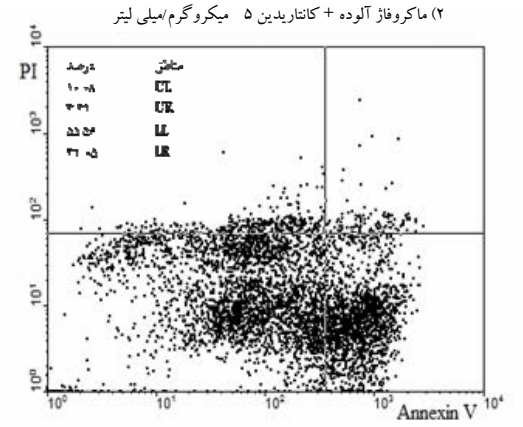
نتایج فلوسایتومتری برای ماکروفاژهای آلوده به انگل پس از مواجه با کانتاریدین ۵۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر DMSO پس از گذشت ۴۸ ساعت، به ترتیب ۶۱/۸۱ درصد (به‌صورت ۴۳/۴۲ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۱/۲۷ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۱۷/۱۱ درصد نکروز) و ۴۴/۴۴ درصد (به‌صورت ۳۱/۰۵ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۱۰/۰۸ درصد نکروز و ۳/۳۱ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری) به دست آمد (تصویر شماره ۲).

نتایج فلوسایتومتری برای پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور پس از مواجه با کانتاریدین ۵۰ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر پس از گذشت ۷۲ ساعت، به ترتیب ۶۸/۵ درصد کشندگی (به‌صورت ۶۳/۲۳ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۵/۲۷ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۰ درصد نکروز) و ۱۴/۲۹ درصد کشندگی (به‌صورت ۱۳/۱۲ مرگ برنامه‌ریزی شده، ۱/۱۲ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۰/۰۵ درصد نکروز) را نشان داد (تصویر شماره ۳).

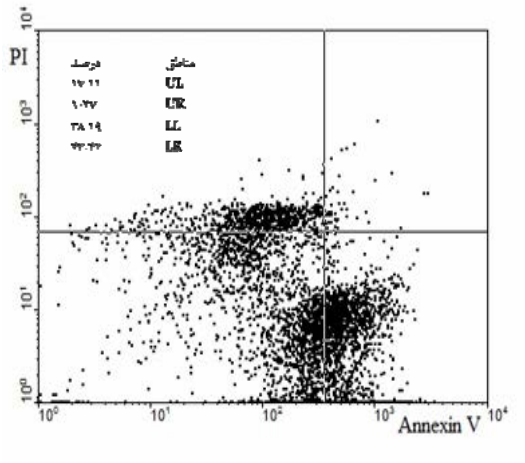
۱) کنترل



۲) ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵ میکروگرم/میلی لیتر

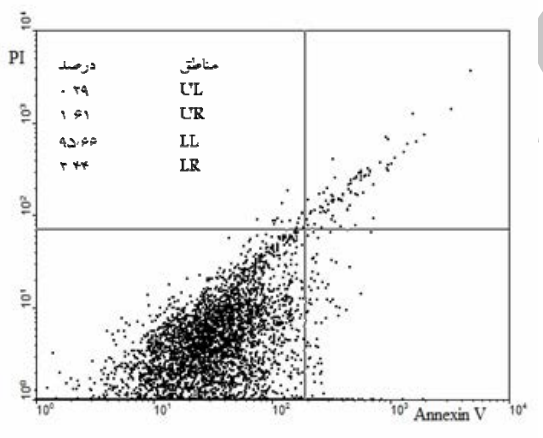


۳) ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر

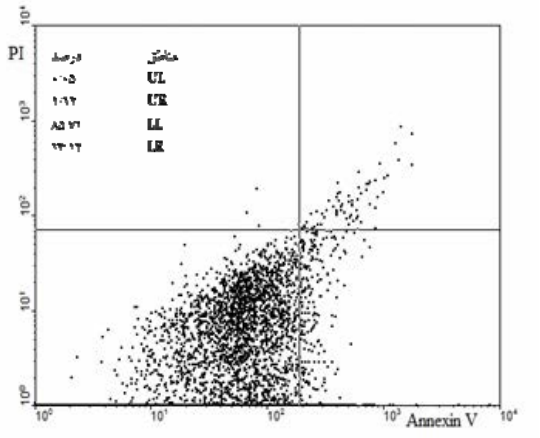


تصویر شماره ۲: نتایج فلوسایتومتری برای ماکروفاژهای آلوده به انگل ماژور با استفاده از نرم افزار CellQuest،۱۴) نمونه کنترل پس از ۴۸ ساعت، ۲) ماکروفاژ آلوده مواجه شده با کانتاریدین ۵ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت، ۳) ماکروفاژ آلوده مواجه شده با کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت.

۱) لیشمانیا ماژور (کنترل)

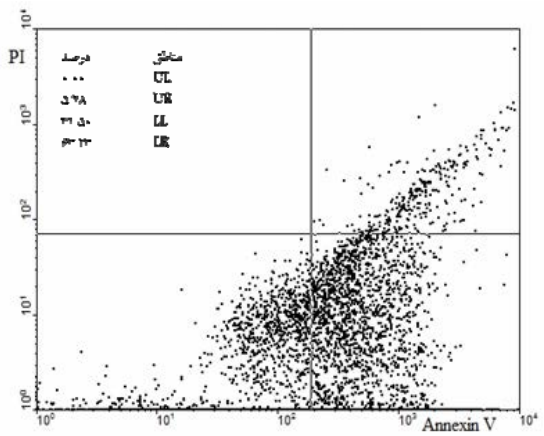


۲) لیشمانیا ماژور + کانتاریدین ۰/۵ میکروگرم/میلی لیتر



www.SID.ir

۳) لیشمانیا ماژور + کانتاریدین ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر



تصویر شماره ۳: نتایج فلوسایتومتری برای پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور پس از مواجه با کانتاریدین با استفاده از نرم افزار CellQuest؛ ۱) نمونه کنترل، پس از ۷۲ ساعت، ۲) پروماستیگوت مواجه شده با کانتاریدین ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۷۲ ساعت، ۳) پروماستیگوت، تیمار شده با کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۷۲ ساعت.

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که بیشترین غلظت کانتاریدین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) DMSO در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور پس از ۷۲ ساعت سبب ۶۳/۲۳ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود. مقدار مرگ برنامه‌ریزی شده در ماکروفاژ آلوده و غیرآلوده پس از مواجه با کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب ۴۳/۴۲ درصد و ۲۱/۳۵ درصد می‌باشد. کانتاریدین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و گذشت ۴۸ ساعت در ماکروفاژ غیرآلوده ۲۳/۷۶ درصد نکروز می‌دهد در حالی که غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر ۷/۲۷ درصد نکروز و ۳۴/۹ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی می دهد. مقدار نکروز و مرگ برنامه ریزی شده در ماکروفاژ بدون دارو (به‌عنوان کنترل) پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۹۷ و ۱۹/۰۶ درصد بود. بنابراین تنها غلظت پایین کانتاریدین در ماکروفاژهای غیرآلوده باعث مرگ برنامه ریزی شده می شود و غلظت‌های بالا باعث نکروز می‌شوند. در یک مطالعه، IC_{50}[1] برای پروماستیگوت ۰/۲۸ ± ۲ میکروگرم در میلی لیتر و برای ماکروفاژ ۲/۶ ± ۷/۷ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شده است(۲۲). همچنین در مطالعه حاضر کانتاریدین باعث کاهش بقای ماکروفاژ در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) شد و میزان ATP را نیز کاهش داد(۲۴،۱۴). بیشتر مطالعات کانتاریدین بروی سلول‌های سرطانی انسان بوده و مشخص شده است در سلول‌های هپاتوما (Hepatoma)، سلول‌های سرطانی کولون، کارسینومای حفره دهان و سلول‌های لوسمی باعث مرگ برنامه‌ریزی می‌شود(۲۶،۲۵،۱۵). ماکروفاژها نقش مهمی در ایجاد پاسخ ایمنی میزبان علیه عفونت‌ها و ترشح سایتوکین‌ها (Cytokines) بر عهده دارد. لیشمانیا دونوانی (Leishmania donovani) و لیشمانیا ماژور ازطریق حذف فاکتور تحریک‌کنندگی کلونی مونوسیت‌ها (Macrophage colony-stimulating factor: M-CSF) مانع از مرگ برنامه‌ریزی شده ماکروفاژ می شوند، ولی رونویسی از ژن‌های TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha)، GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) و IL-6 (Interleukin 6) را افزایش می‌دهند. همچنین لیشمانیا ماژور مانع از رها شدن سیتوکروم c از میتوکندری و در نتیجه فعال‌شدن کاسپاز ۳ ماکروفاژ آلوده می‌شود. لیشمانیا با این عمل به بقای خود در داخل میزبان کمک می کند(۲۸،۲۷). میلتفوسین (Miltefosine) در لیشمانیا دونوانی با کاهش نفوذپذیری غشای میتوکندری باعث افزایش رها شدن سیتوکروم c و نهایتاً القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌شود(۲۹). هنور مکانیسم دقیق القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی توسط کانتاریدین مشخص نیست. اما مطالعات مختلف نشان داده است که کانتاریدین در سلول‌های سرطانی با افزایش فشار اکسیداتیو باعث تخریب DNA سلول شده و آن‌هم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را از مسیر میتوکندری با

1. Inhibitory Concentration

Archive of SID
www.SID.ir

تحریک مولکول p53 القا می کند(۱۷،۱۶). لیشمانیا فاقد کاسپازها هستند. امام دارای پروتئین شبیه کاسپازی بنام متاکاسپاز (Metacaspase) می‌باشند. لیشمانیا برای کنترل جمعیت خود در داخل روده پشه و در داخل ماکروفاژها، دچار مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شود. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در لیشمانیا از طریق جابه‌جایی فسفاتیدل سرین صورت می گیرد. برخی از داروهای ضد لیشمانیا مثل میلتفوسین باعث القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی در لیشمانیا می‌شوند(۲۹، ۳۰). ظاهر شدن فسفاتیدیل سرین در سطح خارجی غشای پروماستیگوت لیشمانیا نشانه‌ایی از مرگ برنامه‌ریزی شده است ولی در آماستیگوت نه تنها مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی صورت نمی گیرد بلکه از طریق PS به ماکروفاژ چسبیده و وارد آن می‌شود(۳۱).

از آن‌جا که لیشمانیا از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ماکروفاژ آلوده، جلوگیری می کند و کانتاریدین با قدرت القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در پروماستیگوت لیشمانیا ماژور و ماکروفاژ آلوده، به حذف انگل کمک می کند، می توان مطالعات بیشتری را در شرایط درون بدنی (In vivo) انجام داد و آن را به عنوان دارویی در درمان لیشمانیوزیس جلدی مورد بررسی قرار داد.

سپاسگزاری

این پروژه در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر تأمین هزینه‌های طرح اعلام می‌دارند.

References

1. Kaur S, Petel H, Sharma V, Garg P, Roy N. Leishmani major sructural database. Int J Integr Biol 2009; 7(2): 63-68.
2. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol 2000; 25(5): 363-370.
3. Athari A, Jalallou N. A Five-Year Survey of cutaneous leishmaniasis in Iran (2001-2006). J Isfahan Med Sch 2006; 24(82): 8-13 (Persian).
4. Bonness K, Aragon IV, Rutland B, Ofori-Acquah S, Dean NM, Honkanen RE. Cantharidin-induced mitotic arrest is associated with the formation of aberrant mitotic spindles and lagging chromosomes resulting, in part, from the suppression of PP2Aalpha. Mol Cancer Ther 2006; 5(11): 2727-2736.
5. May M. Blister beetle intoxication. Chemistry Drug Poisons. 2000 available at: http://chemweb.calpoly.edu/cbailey/377/PapersSp2000/Meredith/. Accessed September 20, 2011.
6. Moed L, Shwayder TA, Chang MW. Cantharidin revisited: a blistering defense of an ancient medicine. Arch Dermatol 2001; 137(10): 1357-1360.
7. Yousefi M. From blisters beetle untile cantharidin. Darmangar 2004; 3 & 4: 36-39 (Persian)
8. Tagwireyi D, Ball DE, Loga PJ, Moyo S. antharidin poisoning due to "Blister beetle" ingestion. Toxicon 2000; 38(12): 1865-1869.
9. Charles R. Blister beetles in alfalfa. 2010 available at: http://aces.nmsu.edu/pubs/_circulars/circ536.html. Accessed September 20, 2011.
10. Li YM, Casida JE. Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(24): 11867-11870.
11. Knapp J, Bokník P, Lüss I, Huke S, Linck B, Lüss H, et al. The protein phosphatase inhibitor cantharidin alters vascular endothelial cell permeability. J Pharmacol Exp Ther 1999; 289(3): 1480-1486.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Kovács P, Pintér M. Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors (phenylarsine oxide and cantharidin) on Tetrahymena. Cell Biochem Funct 2001; 19(3): 197-205.
13. Xiao-hua W, Yuan-qin Y, Cheng-guang S, Fan-dong M, Ping M, You-hong J. Inhibitory effect of Cantharidin on proliferation of A549 cells. Chinese J Cancer Res 2007; 19(4): 283-286.
14. Huan SK, Lee HH, Liu DZ, Wu CC, Wang CC. Cantharidin-induced cytotoxicity and cyclooxygenase 2 expression in human bladder carcinoma cell line. Toxicology 2006; 223(1-2): 136-143.
15. Sagawa M, Nakazato T, Uchida H, Ikeda Y, Kizaki M. Cantharidin induces apoptosis of human multiple myeloma cells via inhibition of the JAK/STAT pathway. Cancer Sci 2008; 99(9): 1820-1826.
16. Efferth T, Rauh R, Kahl S, Tomicic M, Böchzelt H, Tome ME, et al. Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells. Biochem Pharmacol 2005; 69(5): 811-818.
17. Huh JE, Kang KS, Chae C, Kim HM, Ahn KS, Kim SH. Roles of p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways during cantharidin-induced apoptosis in U937 cells. Biochem Pharmacol 2004; 67(10): 1811-1818.
18. Kok SH, Cheng SJ, Hong CY, Lee JJ, Lin SK, Kuo YS, et al. Norcantharidin-induced apoptosis in oral cancer cells is associated with an increase of proapoptotic to antiapoptotic protein ratio. Cancer Lett 2005; 217(1): 43-52.
19. Huh JE, Kang KS, Ahn KS, Kim DH, Saiki I, Kim SH. Mylabrisphalerlata induces apoptosis by caspase activation following cytochrome c release and Bid cleavage. Life Sci 2003; 73(17): 2249-2262.
20. Wang CC, Wu CH, Hsieh KJ, Yen KY, Yang LL. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. Toxicology 2000; 147(2): 77-87.
21. Ghaffarifar F. Leishmania major: in vitro and in vivo anti-leishmanial effect of cantharidin. Exp Parasitol 2010; 126(2): 126-129.
22. Macey MG. Flow cytometry principles and applications. First ed. New Jersey: Humana Press Inc; 2007.
23. Tanaka AK, Valero VB, Takahashi HK, Straus AH. Inhibition of Leishmania (Leishmania) amazonensis growth and infectivity by aureobasidin A. J Antimicrob Chemother 2007; 59(3): 487-492.
24. Massicot F, Dutertre-Catella H, Pham-Huy C, Liu XH, Duc HT, Warnet JM. In vitro assessment of renal toxicity and inflammatory events of two protein phosphatase inhibitors cantharidin and nor-cantharidin. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2005; 96(1): 26-32.
25. Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, Chen CQ. Influence of norcantharidin on proliferation, proliferation-related gene proteins proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2004; 3(4): 603-607.
26. Rauh R, Kahl S, Boechzelt H, Bauer R, Kaina B, Efferth T. Molecular biology of cantharidin in cancer cells. Chin Med 2007; 2: 8.
27. Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by Leishmaniadonovani inhibits macrophage apoptosis. J Immunol 1994; 152(6): 2930-2937.
28. Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC. Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. J Leukoc Biol 2004; 76(1): 95-103.

Archive of SID
www.SID.ir

29. Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant Leishmania donovani promastigotes through mitochondrial dysfunction. Exp Parasitol 2007; 116(1): 1-13.

30. Shaha C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. Indian J Med Res 2006; 123(3): 233-244.

31. Wanderley JL, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. Cell Mol Life Sci 2010; 67(10): 1653-1659.

Archive of SID

www.SID.ir