اثر میلتوفوسین برمرگ سلولی انگل لیشمانیا اینفانتوم

شهرام خادم وطن[1]- محمد جواد غروی[2]- لامع اخلاقی[2]- هرمزد اورمزدی[3]
کاظم موسوی زاده[4] - علی صمدی[5] - رامتین حدیقی[6] - جاسم ساکی[7] – معصومه بخشایش[8]

چکیده

زمینه و هدف: شناسایی مکانیسم اثر داروهای به کارگرفته شده در درمان لیشمانیازیس احشایی در تأیید روش درمانی نقش بسزایی دارد. یکی از موارد ایجاد اثرات جانبی داروهای رایج نظیر گلوکانتیم، اثر مستقیم دارو بر سلول ها و ایجاد نکروز سلولی می باشد. در صورتی که دارویی بتواند به جای ایجاد نکروز انگل لیشمانیا را با القای آپوپتوز از بین ببرد میتوان عنوان کرد که آن دارو مؤثرتر می باشد. در این مطالعه هدف بررسی اثر القایی آپوپتوزیس و مکانیسم های مرگ سلولی توسط داروی میلتوفوسین بر عامل مولد لیشمانیوز احشایی سویه استاندارد ایران بود.

روش تحقیق: اثر سیتوتوکسیک میلتوفوسین بر روی انگل توسط روش MTT انجام شد. مراحل مختلف القای آپوپتوزیس پروماستیگوتها با استفاده از فلوسیتومتری بررسی شد. به طور خلاصه 1×10^5 پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم مجاور شده با دوز IC_{50} میلتوفوسین و سلول های کنترل به بافر بایندینگ همراه با کنژوگه FITC - انکسین V و پروپیدیوم یدید (PI) اضافه شد. سلول ها در دستگاه فلوسایتومتری بررسی و نتایج با استفاده از برنامه Cellquest آنالیز شد. همچنین پروماستیگوت های لیشمانیا در زیر میکروسکوپ از نظر مورفولوژی و اندازه بررسی گشت.

یافته ها: IC_{50} داروی میلتوفوسین با استفاده از تست MTT، 8-7 µmol به دست آمد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ۲۲٪ از سلول های مواجه شده با دوز IC_{50} میلتوفوسین دچار مرگ آپوپتوتیک شدند در حالی که این مقدار در گروه کنترل ۲٪ بود. پس از زمان ۴۸ ساعت درصد سلولهای دچار آپوپتوزیس (Anexin-V FITC مثبت) افزایش یافت (۸۰٪) اما تغییری در گروه کنترل مشاهده نشد.

نتیجه گیری: در ابتدا تصور می شد آپوپتوزیس فقط در جانوران پرسلولی انجام می شود. اما در مطالعات اخیر ثابت شده که پروسه مرگ برنامه ریزی شده در ارگانیسم های یوکاریوتیک تک سلولی نظیر جنس لیشمانیا نیز انجام می گیرد. مطالعه مسیر مرگ سلولی و مکانیسم القا و این که آیا میلتوفوسین مستقیماً بر ارگانیسم اثر می گذارد و یا موجب تولید واسطه های ایجاد آپوپتوزیس می شود در تعیین استراتژی درمانی مؤثر بسیار مهم است.

کلیدواژه ها: لیشمانیا اینفانتوم؛ مرگ سلولی؛ میلتوفوسین

افق‌دانش؛ فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ۱۵؛ شماره ۳؛ پاییز سال ۱۳۸۸)

دریافت: ۱۳۸۷/۹/۲۸ اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۲/۱۶ پذیرش: ۱۳۸۸/۴/۶

۱- **نویسنده مسؤول؛** استادیار انگل شناسی، گروه پارازیتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
آدرس: اهواز- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور- دانشکده پزشکی- گروه پارازیتولوژی
تلفن : ۰۶۱۱-۳۳۶۷۵۴۳ فاکس: ۰۶۱۱-۳۳۳۲۰۳۶ پست الکترونیکی: khademvatan@ajums.ac.ir
۲- دانشیار انگل شناسی، گروه پارازیتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳- استاد انگل شناسی، گروه پارازیتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
۴- دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۵- استادیار بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۶- استادیار انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۷- استادیار انگل شناسی، گروه پارازیتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۸- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیازیس یکی از عوامل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و عقب افتاده ی جهان می باشد. عامل بیماری انگل تک یاخته ی داخل سلولی از خانواده کینتوپلاستیده و جنس لیشمانیا می باشد که سالیانه دوازده میلیون نفر از ساکنان مناطق اندمیک را مبتلا می کند (۱). همچنین، سیصد و پنجاه میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به بیماری می باشند. علائم بیماری به سه صورت پوستی، جلدی مخاطی و احشایی تظاهر می کند که نوع احشایی آن از کشنده ترین و شدید ترین انواع لیشمانیازیس محسوب می شود. لیشمانیازیس احشایی (کالازار) در کشور های فقیر شیوع بیشتری دارد و گونه ی لیشمانیا اینفانتوم در نواحی مدیترانه ای و کشور ایران شایع است. برآورد شده است که سالیانه پانصد هزار نفر به این شکل از بیماری مبتلا می شوند و فرم متداول در کشور ما بیشتر کودکان زیر نه سال را مبتلا می کند که در صورت عدم درمان تا ۹۰ درصد موجب مرگ بیمار می شود (۲,۳). داروهای رایج در درمان این بیماری (آنتیموان پنج ظرفیتی، آمفوتریسین B و...) هر یک دارای اثرات جانبی و محدودیت های خاص خود می باشند. به طور مثال داروهای آنتیموان پنج ظرفیتی دارای اثرات سمی بسیار زیاد، طولانی بودن مدت درمان، درد فراوان ناشی از تزریق در محل و ... می باشند (۲). بنابراین، مطالعه در مورد یافتن داروهای جایگزین در درمان لیشمانیازیس احشایی از اهمیت فراوانی برخوردار است. داروی میلتوفوسین که در ابتدا به عنوان یک ضد سرطان در موارد متاستاز سرطان سینه به پوست استفاده می شده است، از موارد نوید بخشی است که مطالعات زیادی در جهت جایگزینی این دارو در درمان لیشمانیازیس احشایی انجام شده و یا در حال انجام است. مزایای این دارو در خوراکی بودن مصرف آن و هم چنین، اثر مستقیم دارو بر روی انگل و ایجاد مرگ آپوپتوتیک می باشد (۶-۴).

آپوپتوزیس روندی است که در آن سلول ها بدون ایجاد پاسخ ایمنی و التهابی از بین می روند. در ابتدا تصور می شد که پدیده ی آپوپتوزیس فقط در جانداران پر سلولی اتفاق می افتد. اما مطالعات جدید نشان می دهد که در یوکاریوت های تک یاخته ای نظیر لیشمانیا اتفاق می افتد (۷).

با اثبات مرگ آپوپتوتیک در تک یاخته های کینتوپلاستیده مطالعات زیادی در جهت استفاده از ترکیبات و داروهای مختلف نظیر NO[1], DHBA[2], استئاروسرپین و ... برای القای این نوع مرگ انجام شده است (۸,۹). مطالعه ی دقیق فرایند های مرگ سلولی ناشی از داروها در به کارگیری داروهای جدید جهت کنترل بیماری های انگلی بسیار مفید و مؤثر می باشد. مطالعات چندی نشان داده است که میلتوفوسین (HePC) موجب القای نوع خاصی از مرگ بر روی لیشمانیا دونووانی شده است که این کار را از طریق فشرده کردن و قطعه قطعه کردن DNA و اثرات سیتوپلاسمی خاص بر روی انگل انجام می دهد و در نهایت با اثر بر روی DNA باعث القای مرگ آپوپتوزیس می شود (۶).

مطالعات سایتوتوکسیسیتی و اثرات القایی مرگ بر روی سویه های مختلف لیشمانیا دونووانی انجام شده است، اما در کشور ما تاکنون مطالعه ی جامع جهت یافتن IC_{50}[3] و هم چنین، مطالعه ی فرایند مرگ در اثر مصرف داروی میلتوفوسین در سویه های ایرانی انجام نشده است. IC_{50} دوزی از داروست که رشد ۵۰٪ از سلول ها را در مواجه با دارو متوقف می کند و در بررسی اثر داروها استفاده می شود. هدف از این مطالعه، یافتن دوز مؤثر دارو بر روی سویه استاندارد ایرانی لیشمانیا اینفانتوم و هم چنین، مطالعه ی دقیق تر مکانیسم مرگ در برابر دوزهای مختلف و نحوه ی اثر دارو بر سویه ی رایج در کشور ما است.

روش تحقیق

- سویه های استاندارد انگل لیشمانیا اینفانتوم (MCAN/IR/96/LONDON 49) و لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از آزمایشگاه تک یاخته شناسی آقای دکتر محبعلی از دانشکده ی بهداشت دانشگاه تهران تهیه شد. به طور خلاصه $۰/۵\times۱۰^{۶}$ cell/ml پروماستیگوت در محیط RPMI 1649 (سیگما) به همراه ۱۰٪ FCS و

1- Nitric Oxide
2- Pentacyclic Triterpenoid,Dihydrobetulinic Acid
3- Inhibitory Concentration 50%

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی بیوتیک در دمای ۲۴°C کشت داده شد و پس از رسیدن انگل به فاز لگاریتمی از آن جهت مطالعات مختلف استفاده شد.

- رشد و پرولیفراسیون سلولی و اثرات ضد سلولی سیتوتوکسیسیته دارو توسط تست MTT - (2 - yl) - (4,5- Methyl Thiazol - 2 - yl)-3] [2,5 Diphenyltetrazolium Bromide] بررسی شد.

برای اجرای تست MTT از پلیت های الایزا استفاده شد. تعداد ۲×۱۰^{۶}cell/ml پروماستیگوت به هر کدام از چاهک های ۹۶ خانه ای اضافه شد، سپس HePC با غلظت های مختلف از ۱-۱۰۰µmol به هر یک از چاهک ها اضافه شد. پلیت ها در دمای ۲۵°C تا ۴۸ ساعت انکوبه شدند و پس از گذشت مدت زمان مذکور میزان زنده بودن پروماستیگوت های انگلی توسط آزمون کمی رنگ سنجی MTT بررسی شد.

به طور خلاصه MTT Reagent (ml/mg) ۰/۲۵ به هر چاهک حاوی پروماستیگوت اضافه شد.

پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۶°C محلول DMSO برای حل کردن کریستال های فورمازان اضافه شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. سپس جذب نوری پلیت ها توسط دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۴۰ nm بررسی شد. تعداد نسبی سلول های زنده ارتباط مستقیمی با میزان جذب نوری نمونه ها دارد. درصد viability سلول های کنترل و سلول های مواجه شده با دارو با استفاده از این فرمول به دست آمد:

$$\text{Viable Cells \%} = [(A_T - A_B) / (A_C - A_B)] \times 100$$

در این فرمول: A_C جذب نوری سلول های کنترل، A_T جذب نوری سلول های درمان شده با میلتوفوسین و A_B جذب نوری بلانک می باشد. در نهایت نتایج به صورت IC_{50} با غلظتی از دارو که موجب مهار رشد ۵۰٪ سلول ها بیان می شود.

- برای افتراق سلول های نکروتیک و آپوپتوتیک پروماستیگوت های مواجه شده با میلتوفوسین از روش رنگ آمیزی Annexin-V FITC (شرکت ROCH) استفاده شد.

به طور خلاصه سلول های مواجه شده با غلظت IC_{50} میلتوفوسین و همچنین سلول های کنترل دو بار توسط محلول PBS خنک شسته شدند و در ۱۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

مطابق پروتوکل به سلول های ته نشین شده ۱۰۰λ محلول Annexin-V FITC و هم چنین ۱۰۰λ محلول PI (Propidium Iodide) اضافه شد. سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک در دمای ۲۶°C انکوبه شد. شدت رنگ Annexin-V FITC جذب شده به سلول ها توسط دستگاه FACSCalibor بررسی و توسط نرم افزار Cellquest تجزیه و تحلیل شد.

- برای مشاهده ی تغییرات مورفولوژیک در پروماستیگوت های درمان شده یا درمان نشده با IC_{50} میلتوفوسین بدین گونه عمل شد:

سلول ها در دور پایین ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و در محلول PBS به صورت سوسپانسیون در آمدند. سلول ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰ بررسی شدند. حداقل ۲۰ زمینه میکروسکوپی برای هر نمونه مورد مطالعه قرار گرفت. تغییرات مورفولوژیک در زمان های مختلف پس از مواجهه ی پروماستیگوت ها با میلتوفوسین در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

- با استفاده از نرم افزار SPSS 15 و آنالیز رگرسیون خطی IC_{50} به دست آمد. میانگین نتایج ۳ تست مستقل به صورت نتیجه نهایی بیان شد.

یافته ها

اثرات ضد لیشمانیایی میلتوفوسین: اثرات سایتوتوکسیک میلتوفوسین و میزان زنده بودن[1] پروماستیگوت های لیشمانیا اینفانتوم (MCAN/IR/96/LONDON 49) به منظور یافتن IC_{50} توسط تست MTT بررسی شد. تست MTT یک آزمون رنگ سنجی است که جهت بررسی پرولیفراسیون سلول ها به کار گرفته می شود و نحوه عمل آن سنجش تبدیل رنگ تترازولیوم (MTT) به کریستال های فورمازان توسط سلول های زنده می باشد. غلظت دوز کشنده ی داروی میلتوفوسین که در آن ۱۰۰٪ سلول های لیشمانیا اینفانتوم از بین می روند۲۲ µmol به دست آمد.

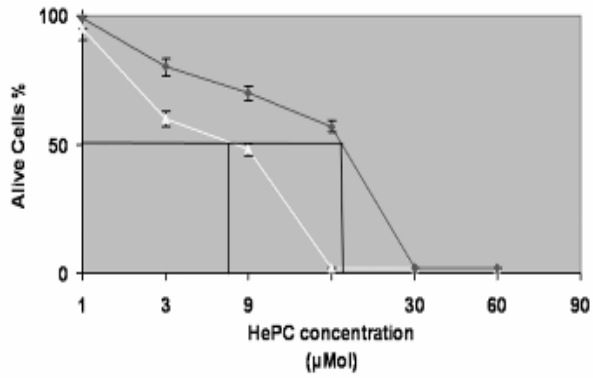
1- Viability

Archive of SID

www.SID.ir

به منظور مقایسه اثرات میلتوفوسین بر روی سویه های استاندارد ایرانی لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور این تست بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور نیز انجام شد که دوز کشنده در لیشمانیا ماژور ۳۲ µmol به دست آمد.

IC_{50} سلول های لیشمانیا اینفانتوم در مواجهه با میلتوفوسین با استفاده از تست MTT، ۸-۷ µmol به دست آمد. IC_{50} لیشمانیا ماژور ۲۳ µmol به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه میزان زنده ماندن لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور در حضور غلظت های مختلف میلتوفوسین

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت های لیشمانیا اینفانتوم در اثر میلتوفوسین: سلول های مواجه شده با (IC_{50}) ۷ µmol میلتوفوسین و هم چنین سلول های کنترل بدون مواجهه با هر گونه دارو توسط میکروسکوپ نوری در فواصل زمانی ۴، ۱۸،۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند.

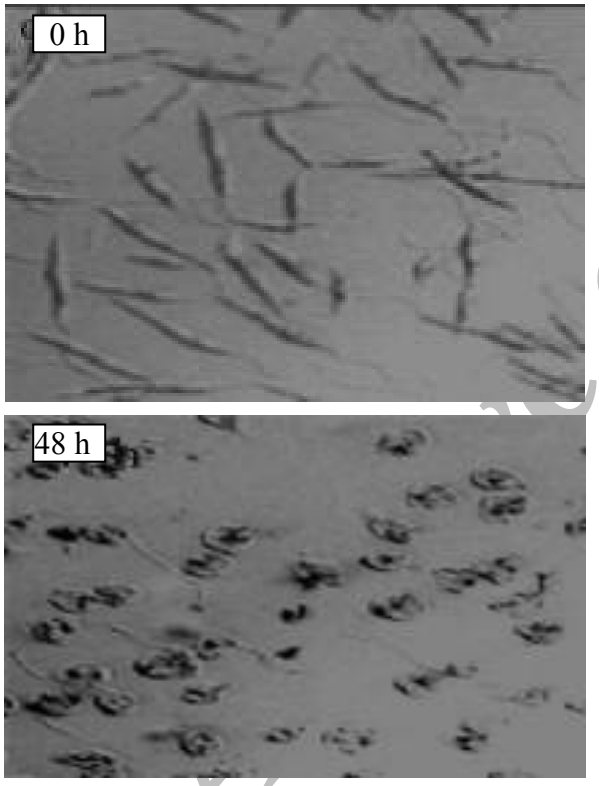
سلول های پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم در پلیت های الایزا کشت داده شد و برای رسیدن به فاز لگاریتمی ۴۸ ساعت در دمای ۲۵°C انکوبه شد. مواجهه ی دارو با پروماستیگوت ها پس از زمان ۴۸ ساعت انجام شد.

تعداد سلول ها در ابتدای مواجهه با دارو ۲ million/ml بود که پس از ۸ ساعت انکوباسیون به ۵-۴ million/ml رسید. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون تعداد سلول های پروماستیگوت زنده به ۵۰ درصد کاهش یافته بود.

در ساعات ۲۴، ۳۶ و ۴۸ تعداد سلول های زنده به میزان بسیار کمتری کاهش یافت.

تعداد سلول های مواجهه شده با دارو (گروه کنترل) تا پایان ۴۸ ساعت به ۱۲-۱۰ million/ml رسید.

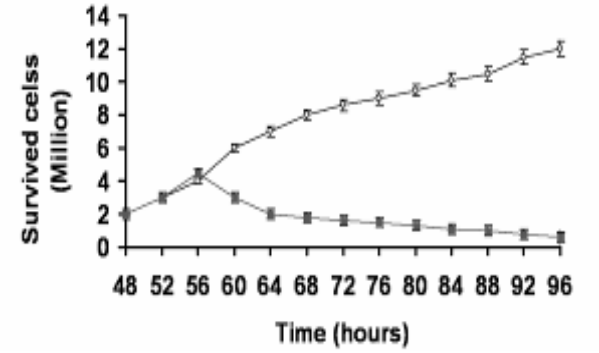
بررسی سلول های مواجه شده با دارو ۴، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از درمان با بزرگ نمایی ۱۰۰ نشان دهنده ی ایجاد تغییرات در سلول ها می باشد. این تغییرات از ۴ ساعت پس از مواجهه با دارو آغاز می گردد و شامل چروکیدگی سلولی[1]، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم[2] و کوچک تر شدن سلول می شود. هیچ گونه تغییری در سلول های کنترل مشاهده نشد (شکل ۲و۳).



شکل ۲: مورفولوژی انگل لیشمانیا اینفانتوم سویه استاندارد تیمار شده با داروی میلتوفوسین (۷ میکرومول) در ساعت صفر و ۴۸ در بزرگ نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری. گرد شدن و کوچک تر شدن سلول ها در ساعت ۴۸ مشهود است.

1- Cell Shrinkage
2- Cytoplasmic Condensation

www.SID.ir



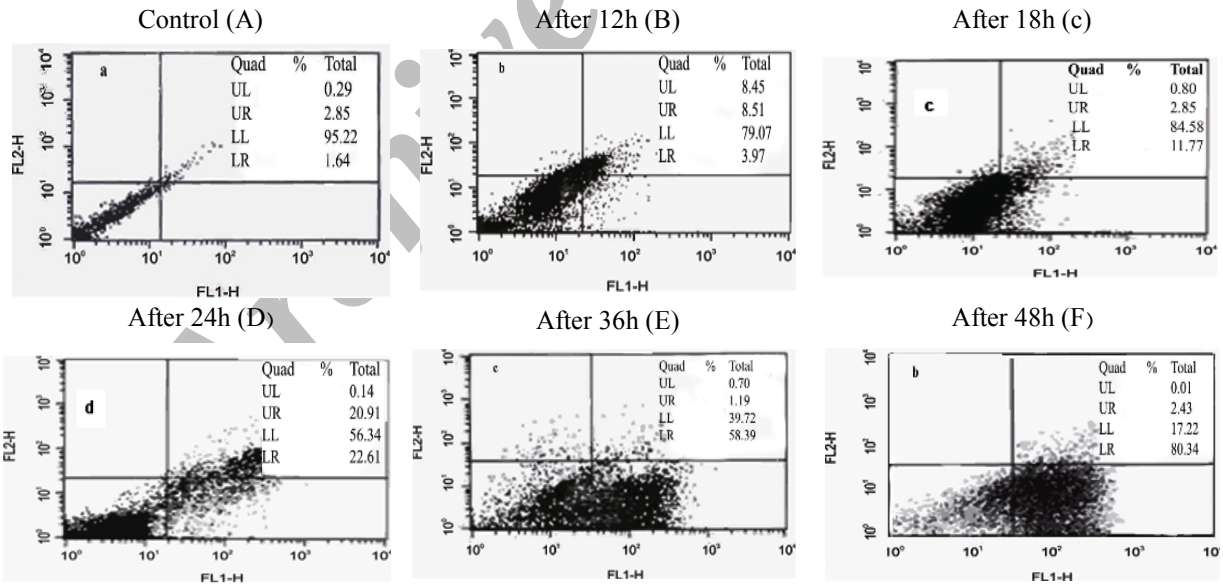
شکل۳: افزایش و کاهش تعداد سلول ها در گروه کنترل(●) و مواجه شده با دارو (▪). سلول ها ۴۸ ساعت پس از کشت اولیه در پلیت ها با دارو مواجه شدند. تعداد پروماستیگوت های مواجه شده با HePC پس از یک افزایش اولیه در ساعت های ۳۶،۲۴،۱۶ و ۴۸ پس از مواجهه با دارو کاهش نشان می دهند.

بررسی مرگ سلولی لیشمانیا اینفانتوم با استفاده از فلوسایتومتری: درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک و هم چنین دچار مرگ نکروز با استفاده از فلوسایتومتری در زمان های مختلف ۴، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بررسی شد. در طی مراحل اولیه مرگ سلولی برنامه ریزی شده چندین تغییر عمده در غشای سلولی اتفاق می افتد.

یکی از این تغییرات جا به جایی فسفاتیدیل سرین از سمت داخل غشا به سمت خارجی غشا پلاسمایی است. Annexin-V نوعی پروتئین متصل شونده فسفولیپیدی وابسته به یون کلسیم است که میل ترکیبی بالایی به فسفاتیدیل سرین دارد و به طور معمول برای تشخیص مراحل ابتدایی القای مرگ آپوپتوتیک در سلول ها به کار می رود.

نتایج آنالیز پروماستیگوت های مواجه شده با Annexin-V-FLUOS نشان داد که: پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون سلول های لیشمانیا اینفانتوم با ۲۲ µmol میلتوفوسین، ۱۱/۷٪ سلول ها دچار آپوپتوزیس شده بودند در حالی که تنها ۳٪ سلول ها (+) PI و دچار نکروزیس شده بودند. پس از ۲۴ ساعت میزان آپوپتوزیس در سلول های مواجهه شده با میلتوفوسین به ۶/۲۲٪ رسید.

مطالعات فلوسایتومتری نشان داد که پس از ۴۸ ساعت از مواجه با داروی میلتوفوسین ۸۰ ٪ سلول ها (Annexin-V+) دچار مرگ آپوپتوزیس شده بودند در حالی که تنها ۴٪ سلول های کنترل Annexin-V + بودند (شکل ۴) .



شکل ۴: آنالیز فلوسیتومتری پروماستیگوت های تیمار شده با ۲۲ میکرومول میلتوفسین در زمان های مختلف. میلتوفوسین موجب القای مرگ آپوپتوتیک (Annexin V مثبت) در سلول ها می گردد و درصد سلول های دچار مرگ نکروتیک با پیشرفت زمان تغییری نمی کند (PI مثبت). (LR) منطقه سلولهای آپوپتوتیک (باند شده با انکسین) و (UL) منطقه ی سلول های دچار مرگ نکروزیس (باند شده با PI، UR) منطقه سلول های باند شده با هردو رنگ انکسین و پروپیدیوم، (LL) منطقه ی سلول های زنده A, B, C, D, E, F به ترتیب نتایج آنالیز فلوسیتومتری گروه کنترل ۱۲،۱۸،۲۴،۳۶ و ۴۸ ساعت پس از مواجهه با ۲۲ میکرومول میلتوفوسین می باشد.

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه اثرات میلتوفوسین بر روی سویه ی استاندارد انگل لیشمانیا اینفانتوم و نوع القای مرگ سلولی بررسی شد. مطالعه ی مکانیسم های القای مرگ سلولی از روش های مؤثر در بررسی داروهای جدید می باشد. درمان رایج لیشمانیوز احشایی از ایده آل های یک درمان سریع و راحت به دور است: از سال ۱۹۱۱ که ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان، تولید شده است؛ این دارو هم چنان به عنوان داروی خط اول در درمان، استفاده می شود. اثرات جانبی و سیتوتوکسیک بسیار زیاد، مقاومت های دارویی و هم چنین طولانی بودن مدت زمان درمان، محققین را بر آن داشته که به دنبال داروی جایگزین باشند (۳). ترکیبات بسیار زیادی نظیر آنتی بیوتیک های ضد قارچی (آمفوتریسین B، وریکونازول و ...)، پنتامیدین، آلوپورینول و ... در درمان به کار گرفته شده اند، اما هیچ یک نتوانسته اند جایگزین مناسب گلوکانیتم باشند (۲,۱۰).

میلتوفوسین (هگزاسیل فسفوکولین) از داروهای جدیدی است که امید فراوانی را جهت درمان لیشمانیا برانگیخته است. این دارو که تنها دارویی است که به صورت خوراکی تجویز می گردد، در اصل یک داروی ضد سرطان می باشد که در ابتدا جهت درمان متاستاز سرطان سینه به پوست استفاده شده است. میلتوفوسین با تجمع در غشای پلاسمایی موجب تغییر در عملکرد و در نتیجه مرگ سلول می شود (۴).

اثرات ضد انگلی دارو بر روی انتاموبا هیستولیتیکا، اکانتاموبا، تریپانوزوما و ... مطالعه شده است. هم چنین مطالعات فراوانی بر روی انگل لیشمانیا دونووانی که در هندوستان اندمیک می باشد انجام گرفته (۱۲-۱۱) و در ایران محبعلی و همکاران این دارو را بر روی سویه استاندارد لیشمانیا ماژور بررسی کرده اند (۱۳). اما نیاز به مطالعه در مورد اثرات سیتوتوکسیک دارو، دوز IC_{50} و همچنین مکانیسم مرگ القایی در لیشمانیا اینفانتوم که در کشور ما اندمیک است احساس می شد. در این مطالعه دوز IC_{50} میلتوفوسین با استفاده از تست رنگ سنجی MTT به دست آمد. بر خلاف مطالعات قبلی انجام شده بر روی انگل لیشمانیا دونووانی توسط ورما (۶) و پاریس (۱۴) سویه استاندارد لیشمانیا اینفانتوم نسبت به میلتوفوسین بسیار حساس تر می باشد و دوز IC_{50} آن در این بررسی ۸-۷ µmol به دست آمد.

مقایسه ی IC_{50} پروماستیگوت های لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور در این مطالعه، نشانگر حساسیت بالای لیشمانیا اینفانتوم می باشد. دوز IC_{50} لیشمانیا ماژور ۲۲ µmol به دست آمد. جهت بررسی اثرات این دارو در شرایط داخل سلولی (آماستیگوتی) مطالعات مشابه انجام شد که نتایج تست ها بر روی پروماستیگوت ها را تأیید کرد. یکی از محاسن داروی میلتوفوسین بر خلاف داروهای رایج که معمولاً با اثر مستقیم موجب کشته شدن انگل می شوند، القای غیر مستقیم مرگ به صورت آپوپتوزیس می باشد (۱۴).

واژه ی آپوپتوزیس برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ توسط کِرِ و همکارانش به کار گرفته شد و در آن تغییرات مورفولوژیک نظیر فشردگی کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA ژنومی، گرد شدن و چروکیدگی سلول و ... اتفاق می افتد. مرگ ناشی از آپوپتوزیس بر خلاف نکروزیس (که منجر به تورم سلول و در نهایت ترکیدگی و خروج محتویات داخل سلول به محیط بین سلولی می گردد) عوارض کمتری داشته و مانع از ایجاد پاسخ های ایمنی ثانویه می شود. در ابتدا تصور می شد که آپوپتوزیس تنها در جانداران پر سلولی اتفاق می افتد در حالی که مطالعات جدید نشان دهنده این است که این روند از ۱-۲ میلیارد سال پیش در تک یاخته های یوکاریوتی نظیر خانواده کینتوپلاستیدا نیز رخ می دهد و این موجودات از این نوع مرگ در جهت کنترل جمعیت سلولی خود استفاده می کنند (۱۵).

مطالعه ها نشان داده که تجویز برخی داروها موجب القای مرگ سلولی در انگل لیشمانیا می شود. در اثر القای آپوپتوزیس تغییرات در سه سطح دیواره سلولی، سیتوپلاسم و هسته سلول اتفاق می افتد (۶,۱۴,۱۶) که این تغییرات با استفاده از روش های مختلف در مطالعه ی ما اثبات شد.

تجویز دوز IC_{50} موجب خروج فسفاتیدیل سرین از غشای داخلی به خارجی سیتوپلاسم می شود. این تغییر سمت فسفاتیدیل سرین یکی از نشانه های اولیه القای مرگ به صورت آپوپتوزیس است (۱۴) که توسط رنگ آمیزی Annexin اثبات شد. بیشترین میزان مرگ آپوپتوتیک پس از ۴۸ ساعت مواجهه با دارو مشاهده شد. از

Archive of SID
www.SID.ir

دیگر مزایای تشخیصی Annexin-V FITC توانایی افتراق بین سلول های آپوپتوتیک (Annexin-V+ و PI-)، سلول نکروز (Annexin- V + و PI+) و سلول های زنده (Annexin-V - و PI-) می باشد.

خانواده ی کسپازها از آنزیم هایی هستند که در روند آپوپتوزیس جانداران پر سلولی نقش اساسی دارند. این آنزیم ها با عملکرد آبشاری خود موجب ایجاد واکنش های آپوپتوزیس و در نهایت مرگ سلول می شود. مطالعات جدید نشان دهنده ی این است که ژن Caspase در انگل های لیشمانیا وجود ندارد، بلکه هومولوگ آن ژنی به نام متاکسپاز است. نقش متاکسپاز در القای مرگ سلولی در مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. از مواردی که نشان دهنده ی اثر کاسپازها و مراحل پایانی آپوپتوزیس می باشد خرد شدن DNA به قطعات الیگونوکلئوزومی می باشد (۱۷).

در این بررسی با استفاده از تکنیک های مختلف القای آپوپتوزیس بر پروماستیگوت های لیشمانیا اینفانتوم اثبات شد. هم چنین مطالعات بیشتر بر اشکال آماستیگوت انگل و هم چنین بیان ژن های مختلف دخیل در آپوپتوزیس انگل در دست انجام است. از آنجایی که در سال های اخیر از میلتوفوسین در درمان لیشمانیوز استفاده شده، فهم بهتر مکانیسم مرگ سلولی در اتخاذ استراتژی درمانی مؤثر مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه تک یاخته شناسی دانشکده ی بهداشت دانشگاه تهران به جهت همکاری و تهیه سویه های استاندارد انگل لیشمانیا قدردانی می شود. هم چنین از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران تشکر می شود.

References:

1- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27: 305-318.

2- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, a treatment, a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis 2002; 2: 494-501.

3- Murray H W, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366: 1561-1577.

4- Unger C, Peukert MH, Sindermann P. Hilgard G. Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. Cancer Treat Rev 1990; 17: 243- 246.

5- Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med 1999; 341: 1795-1800.

6- Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(8): 3010-5.

7- Hamann A, Brust D, Osiewacz HD. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. Trends Microbiol 2008; 16(6): 276-83. Review.

8- Wanderley JL, Benjamin A, Real F, Bonomo A, Moreira ME, Barcinski MA. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. Braz J Med Biol Res 2005; 38(6): 807-12.

9- Shaha C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. Indian J Med Res 2006; 123(3): 233-44. Review.

10- Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 2008; 21(5): 483-8.

Archive of SID

www.SID.ir

11- Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, Hilgard P, Murray H. W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. Lancet 1998; 352: 1821– 1823.

12- Palumbo E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review Braz J Infect Dis 2008; 12(1): 2-4.

13- Esmaeili J, Mohebali M, Edrissian GH, Rezayat SM, Ghazi-Khansari M, Charehdar S. Evaluation of Miltefosine against LEISHMANIA MAJOR (MRHO/IR/75/ER): In Vitro and In Vivo Studies. Acta Medica Iranica 2008; 4 (3): 191-196.

14- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(3): 852-9.

15- Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote Leishmania major involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. Cell Death Differ 2002; 9: 65-81.

16- Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant Leishmania donovani promastigotes through mitochondrial dysfunction. Exp Parasitol 2007; 23-28.

17- Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. Cell Death Differ 2008; 15(1): 113-22.

Archive of SID

www.SID.ir

Miltefosine Effect on Cell Death of Leishmania Infantum

Shahram Khademvatan[1], Mohammad J. Gharavi[2], Lameh Akhlaghi[2], Hormazd Oormazdi[3], Kazem Mousavizadeh[4], Ali Samadi[5], Ramtin Hadighi[6], Jasem Saki[7], and Masoumeh Bakhshayesh[8]

Abstract

Background and Aim: Discovering the drug mechanisms in visceral leishmaniasis is very important to confirm treatment methods. The direct effect on the cell membrane and induction of necrosis are the causes of side-effects in conventional drugs like Glucantime. Therefore, if a drug induces apoptosis but not necrosis in leishmania, we could conclude that the drug is more effective. The aim of this study was the assessment of miltefosine on cell death mechanisms and the apoptosis of standard strain of lishmania infantum in Iran.

Materials and Methods: The cytotoxic effect of miltefosine was studied with colorimetric assay (MTT) and the promastigotes apoptosis was studied with flow cytometry. In summary, 10^5 leishmania infantum promastigotes treated with IC_{50} dose of miltefosine, and control cells were added to binding buffer with FITC conjugate, annexin V and propidum iodide (PI). The cells were studied with flowcytometry and the results were analyzed with cell quest program. Morphology and cell size of promastigote were studied.

Results: IC_{50} of Miltefosine were calculated 7-8 µmol. After a 24-hour incubation of treated cells with miltefosine, 22% were annexin-V FITC positive but only 2% of control cells were annexin-V FITC positive. After 48 hours the percent of apoptotic cells increased (80% annexin-V FITC) whereas no change was detected in control group.

Conclusion: Initially, it was assumed that apoptosis emerged with metazoan. Recently, several studies have demonstrated that a process of apoptosis also operates in eukaryotic organisms including various species of leishmania. Studying the precise mechanism of cell death pathway and induction of death in leishmania treated with miltefosine is very important for planning effective treatment strategies.

Keywords: Leishmania infantum, apoptosis, miltefosine

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2009; Vol. 15, No. 4

[1]- **Corresponding Author:** PhD, Assistant Professor, Department of Parasitology, Jondi Shapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel: +98- 611-3367543-50 **Fax:** +98- 611-3332036 **Email:** Khademvatan@ajums.ac.ir.com
[2]- Associate Professor, Department of Parasitology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]- Professor, Department of Parasitology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]- Associate Professor of Pharmacology, Department of Basic Sciences and Cellular & Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5]- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Cellular and Molecular Research Center, Iran
[6]- Assistant Professor, Department of Parasitology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[7]- PhD, Assistant Professor, Department of Parasitology, Jondi Shapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[8]- MSc. Department of Basic Sciences and Cellular & Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Archive of SID

www.SID.ir