

Cantharidin-Induced Apoptosis in Leishmania Major Promastigotes and Macrophages Infected by Leishmania Major Amastigotes in Vitro

Yahya Maroufi¹,
Fatemeh Ghaffarifar²,
Abd-Alhosein Dalimi²,
Zohreh Sharifi³,
Zuhair Hassan⁴

¹ Ph.D Student of Medical Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

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

³ Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

⁴ Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received February 6, 2012 ; Accepted May 22, 2012)

Abstract

Background and purpose: *Leishmania* is flagellated protozoa and causative agent of leishmaniasis. It is one of the main public health problems in developing countries. Cantharidin is terpenoid component that exists in Meloidae and Oedemeridae beetles. Cantharidin is vesicant and could induce apoptosis in cancerous cells. This study was performed to determine the role of cantharidin in inducing apoptosis in the *Leishmania* promastigotes and macrophages infected with parasite.

Materials and methods: In this experimental study the effect of cantharidin was evaluated at concentration range of 0.5-50 µg/mL on the *L. major* promastigotes and concentration range of 5, 20 and 50µg/mL on macrophages infected with *L. major* after 24, 48 and 72hrs by flow cytometry assay.

Results: Results showed that cantharidin with concentration levels of 50 µg/mL and 0.5 µg/mL has 68.50% cytotoxicity (as 63.23% apoptosis, 5.27% late apoptosis and 0% necrosis) and 14.29% cytotoxicity (as 13.12% apoptosis, 1.12% late apoptosis and 0.05% necrosis) in promastigotes after 72hrs, respectively. Cytotoxicity 0.5 µg/mL and 50 µg/mL cantharidin in infected macrophages after 48hrs was 61.81% (as 43.42% apoptosis, 1.27% late apoptosis and 17.11% necrosis) and 44.44% (as 31.05% apoptosis, 10.08% necrosis and 3.31% late apoptosis), respectively. Cytotoxicity of 50µg/mL and 5µg/mL cantharidin in non-infected macrophages after 48hrs was also 49.34% (as 21.35% apoptosis, 4.23% late apoptosis and 23.76% necrosis) and 43.79% (as 34.90% apoptosis, 7.27% necrosis and 1.61% late apoptosis), respectively.

Conclusion: This research indicates that cantharidin at different concentration and times could induce apoptosis in *L. major* promastigotes and macrophages infected with amastigotes.

Keywords: Apoptosis, cantharidin, flow cytometry, *Leishmania major*

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

یحیی معروفی^۱
فاطمه غفاری فر^۲
عبدالحسین دلیمی^۲
زهرة شریفی^۳
زهیر حسن^۴

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیا تک یاخته‌ای تاژکدار عامل لیشمانیوزیس است و مشکل عمده سلامت در بسیاری از کشورها، به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه است. کانتاریدین ترکیبی ترپنوتیدی است که در سوسک‌های خانواده Meloidae و Oedomeridae وجود دارد و ماده‌ای تاول‌زاست که در سلول‌های سرطانی، مرگ برنامه‌ریزی شده را القاء می‌کند. این مطالعه جهت تعیین اثر کانتاریدین 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 دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide: DMSO) پس از ۷۲ ساعت در پروماستیگوت‌ها به ترتیب ۶۸/۵ درصد کشتگی (۶۳/۲۳ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ۵/۲۷ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و صفر درصد نکروز) و ۱۴/۲۹ درصد کشتگی (۱۳/۱۲ مرگ برنامه‌ریزی شده، ۱/۱۲ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری و ۰/۰۵ درصد نکروز) می‌دهد. میزان کشتگی کانتاریدین ۵۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بر ماکروفاژ آلوده پس از گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب 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 کشتگی کانتاریدین ۵۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بر ماکروفاژ غیر آلوده پس از گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب 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 غلظت‌های متفاوت باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آپوتوز، فلوسایتومتری، کانتاریدین، لیشمانیا ماژور

مقدمه

شکل جلدی، جلدی - مخاطی و احشایی وجود دارد. حدود ۱۲ میلیون نفر در ۸۸ کشور دنیا به لیشمانیازیس

لیشمانیا جزو تک یاختگان تاژکدار و عامل بیماری لیشمانیوزیس است. لیشمانیوزیس (leishmaniosis) به

E-mail: ghafarif@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: فاطمه غفاری فر - تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی پزشکی

۱. دانشجوی دکتری تخصصی انگل‌شناسی 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 تصویب: ۹۱/۳/۲

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۱/۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۷

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 به وجود می‌آید که از چند ماه تا یک سال باقی خواهد ماند. درمان لیشمانیوزیس با ترکیبات آنتی‌موآن (Antimonial compounds)، شامل استیوگلوکونات سدیم (Sodium stibogluconate) و آنتی‌موآن مگلو مین (Meglumine antimonate) انجام می‌شود. علاوه بر عوارض این داروها، احتمال عود بیماری نیز وجود دارد (۲،۱).

کانتاریدین اولین بار در سال ۱۸۱۰ توسط رویکت (Robiquet) در سوسک *Lytta vesicatoria* شناسایی و نام گذاری گردید (۴). کانتاریدین (Cantharidin) از کلمه یونانی *Kanthalos* به معنی سوسک است. کانتاریدین جزو ترکیبات ترپنوئیدی و در همولنف 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 ماده‌ای تاول‌زا است که به سوسک‌های میلوئیده، سوسک‌های تاول‌زا هم گفته می‌شود (۵). کانتاریدین حدود ۲۰۰۰ سال پیش در چین به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گرفته و صد سال پیش، از آن برای درمان زگیل استفاده می‌شد (۶). حکیم جرجانی چگونگی استفاده از سوسک تاول‌زا (ذرا ریخ) 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 مسمومیت

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)، به عنوان پروتئین فسفاتاز معرفی شد (۱۰). کانتاریدین فسفریلاسیون پروتئین‌های تنظیمی را افزایش می‌دهد (۴، ۱۱-۱۳). (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 مهارکننده‌های 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 (۱۶-۱۹). (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، قطعه‌قطعه شدن DNA و متلاشی شدن هسته، جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی غشای سلول به سطح خارجی آن و همچنین فعال شدن پروتئین‌هایی به نام کاسپازها است (۲۰). هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر کانتاریدین در ایجاد

مرگ برنامه ریزی شده سلولی در لیشمانیا ماژور (Leishmania major) و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است. گروه کنترل شامل پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور، ماکروفاژ غیر آلوده و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور بدون کانتاریدین و گروه تجربی شامل گروه های پروماستیگوت لیشمانیا ماژور، ماکروفاژ غیر آلوده و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور به همراه دوزهای 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 غیر فعال شده (شرکت Gibco: انگلستان) در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد کشت داده شد.

تهیه غلظت های کانتاریدین

کانتاریدین از شرکت Sigma خریداری شد و با غلظت ۲۰ درصد در ۱ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید Dimethyl sulfoxide: DMSO به صورت محلول استوک، تهیه شد، که قابل نگهداری در یخچال بود. غلظت های ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از استوک با استفاده از محیط کشت RPMI 1640 تهیه و در یخچال نگهداری شد (۲۱).

کشت ماکروفاژهای صفاقی موش و آلوده کردن آنها

برای جداسازی ماکروفاژهای صفاق موش ۳ میلی لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل به صفاق موش Balb/c تزریق شد و دوباره مایع صفاقی کشیده شد. سپس با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و ۲ بار با PBS سرد شستشو داده شدند (۲۲).

سپس تعداد 10^5 ماکروفاژ در میلی لیتر شمارش شد و در پلیت کشت ۹۶ خانه ای به همراه محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰۰ واحد به ازای هر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد گذاشته شد. برای آلوده کردن ماکروفاژها تعداد 10^6 پروماستیگوت (Promastigote) انگل در میلی لیتر در مرحله ایستایی (Stationary) شمارش و به چاهک حاوی ماکروفاژ افزوده شد. پس از ۶ ساعت برای حذف ماکروفاژهای نچسبیده به ته چاهک و پروماستیگوت وارد نشده به درون ماکروفاژ، مایع رویی چاهک دور ریخته و محیط کشت تازه حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد به چاهک ها اضافه گردید.

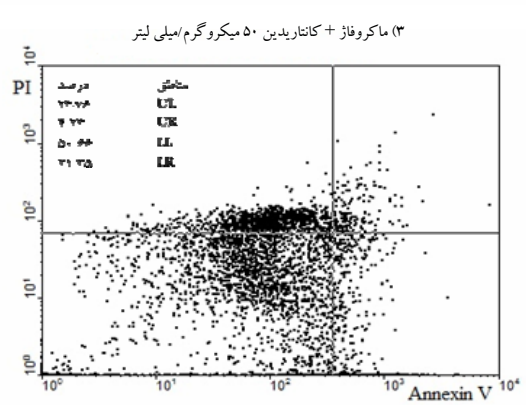
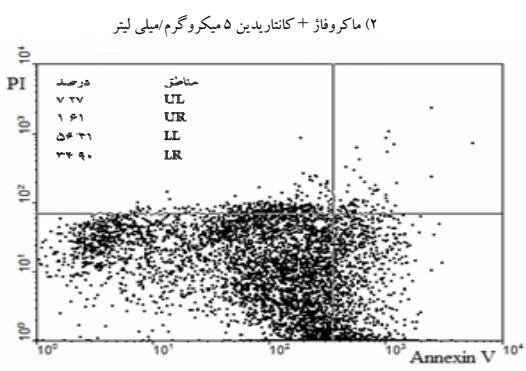
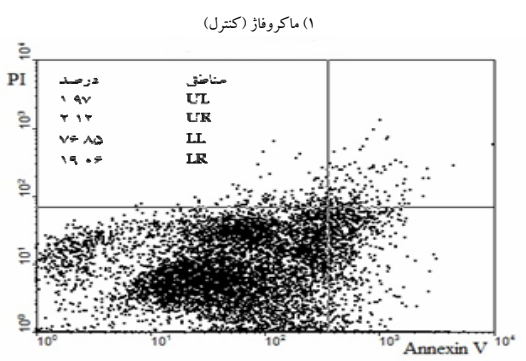
افزودن کانتاریدین به چاهک ها

تعداد 10^6 پروماستیگوت لیشمانیا در میلی لیتر در مرحله لگاریتمی رشد، توسط لام ثوبار شمارش گردید و در پلیت کشت ۲۴ خانه ای به همراه محیط کشت RPMI 1640 با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شد (۲۳، ۲۱). کانتاریدین با غلظت نهایی ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به چاهک های حاوی پروماستیگوت انگل و با غلظت ۵، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به ماکروفاژهای آلوده به انگل و ماکروفاژهای غیر آلوده اضافه شد. هر نمونه به صورت سه بار تکرار گذاشته شد.

فلوسایتومتری برای بررسی مرگ برنامه ریزی شده سلولی در نمونه ها

برای انجام فلوسایتومتری از کیت Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioVision; USA) استفاده شد و نمونه ها پس از زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جمع آوری و هم چنین ماکروفاژهای آلوده به انگل پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت جمع آوری شدند. برای جمع آوری ماکروفاژها از تریسین ۰/۱ درصد با EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) ۰/۲ درصد

درصد کشندگی (۲۱/۳۵) درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی، ۴/۲۳ درصد مرگ برنامه ریزی شده تأخیری و ۲۳/۷۶ درصد نکروز) بود (تصویر شماره ۱).



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 شده تأخیری)، LL (Low Left) ناحیه چپ و پایین (سلول زنده)، LR (Low Right) ناحیه راست و پایین (مرگ برنامه ریزی شده سلولی).

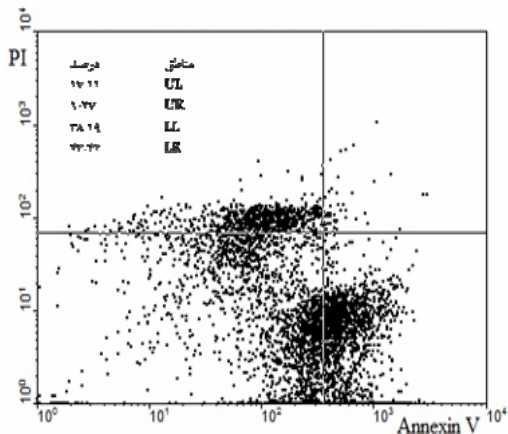
استفاده شد (۲۲). نمونه جمع آوری شده در میکروتیوب، با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بر طبق دستورالعمل کیت، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ (Binding)، ۵ میکرولیتر آنکسین (Annexin V) و ۵ میکرولیتر پروپیدیوم یداید (Propidium iodide) اضافه و میکروتیوب به 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 برنامه ریزی شده اولیه و تأخیری برای آنکسین مثبت می شوند. پروپیدیوم یداید (PI) به DNA سلول متصل و چون قادر به ورود به سلول با غشای سالم نیست، تنها در سلول هایی که غشای آنها متلاشی و یا در حال متلاشی شدن هستند، مثبت می شود. سلول زنده فاقد PS در سطح خارجی خود هستند و PI هم قادر به عبور از غشا نیست، بنابراین سلول زنده، هم برای آنکسین و هم برای PI منفی محسوب می شوند.

تجزیه و تحلیل داده ها و نتایج فلوسایتومتری رسم تصاویر مربوط به داده های فلوسایتومتری و محاسبه میانگین مرگ سلولی نمونه ها به صورت درصدی، با استفاده از نرم افزار CellQuest صورت گرفت.

یافته ها

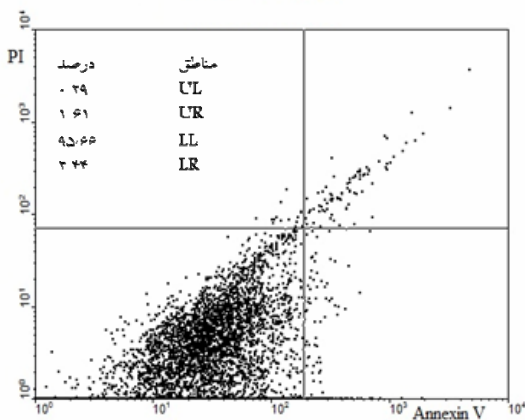
نتایج فلوسایتومتری برای ماکروفاژهای غیرآلوده پس از مواجه با کانتاریدین ۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر DMSO و گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب به صورت ۴۳/۷۹ درصد کشندگی (به صورت ۳۴/۹ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی، ۷/۲۷ درصد نکروز و ۱/۶۱ درصد مرگ برنامه ریزی شده تأخیری) و ۴۹/۳۴

۳) ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر

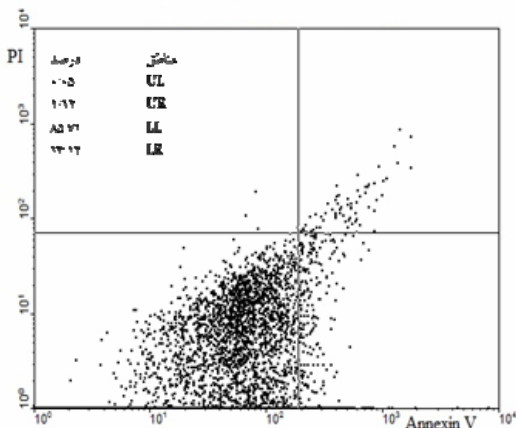


تصویر شماره ۲: نتایج فلوسایتومتری برای ماکروفاژهای آلوده به انگل ماژور با استفاده از نرم افزار CellQuest (۱)؛ نمونه کنترل پس از ۴۸ ساعت، (۲) ماکروفاژ آلوده مواجه شده با کانتاریدین ۵ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت، (۳) ماکروفاژ آلوده مواجه شده با کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت.

(۱) لیشمانیا ماژور (کنترل)



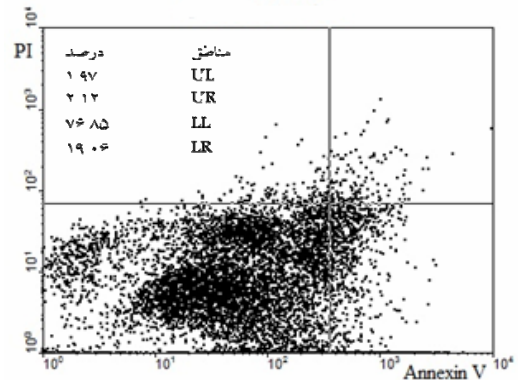
(۲) لیشمانیا ماژور + کانتاریدین ۰/۵ میکروگرم/میلی لیتر



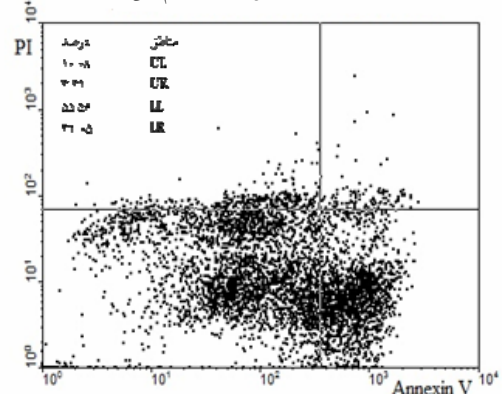
نتایج فلوسایتومتری برای ماکروفاژهای آلوده به انگل پس از مواجه با کانتاریدین ۵۰ و ۵ میکروگرم در میلی لیتر DMSO پس از گذشت ۴۸ ساعت، به ترتیب ۶۱/۸۱ درصد (به صورت ۴۳/۴۲ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی، ۱/۲۷ درصد مرگ برنامه ریزی شده تأخیری و ۱۷/۱۱ درصد نکروز) و ۴۴/۴۴ درصد (به صورت ۳۱/۰۵ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی، ۱۰/۰۸ درصد نکروز و ۳/۳۱ درصد مرگ برنامه ریزی 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 میلی لیتر پس از گذشت ۷۲ ساعت، به ترتیب ۶۸/۵ درصد کشندگی (به صورت ۶۳/۲۳ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی، ۵/۲۷ درصد مرگ برنامه ریزی شده تأخیری و ۰ درصد نکروز) و ۱۴/۲۹ درصد کشندگی (به صورت ۱۳/۱۲ مرگ برنامه ریزی شده، ۱/۱۲ درصد مرگ برنامه ریزی شده تأخیری و ۰/۰۵ درصد نکروز) را نشان داد (تصویر شماره ۳).

(۱) کنترل

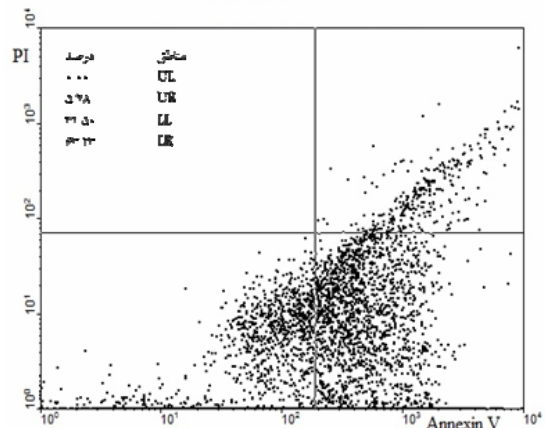


(۲) ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵ میکروگرم/میلی لیتر



برنامه ریزی شده می شود و غلظت های بالا باعث نکروز می شوند. در یک مطالعه¹، IC_{50} برای پروماستیگوت 0.28 ± 2 میکروگرم در میلی لیتر و برای ماکروفاژ 2.6 ± 7.7 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 (۱۴، ۲۴). بیشتر مطالعات کانتاریدین بروی سلول های سرطانی انسان بوده و مشخص شده است در سلول های هپاتوما (Hepatoma)، سلول های سرطانی کولون، کارسینومای حفره دهان و سلول های لوسمی باعث مرگ برنامه ریزی می شود (۱۵، ۲۵، ۲۶). ماکروفاژها نقش مهمی در ایجاد پاسخ ایمنی میزبان علیه عفونت ها و ترشح سایتوکین ها (Cytokines) بر عهده دارد. لیشمانیا دونوانی (*Leishmania donovani*) و لیشمانیا ماژور از طریق حذف فاکتور تحریک کننده کلونی مونوسیت ها (Macrophage colony-stimulating factor: M-CSF) مانع از مرگ برنامه ریزی شده ماکروفاژ می شوند، ولی رونویسی از ژن های (Tumor necrosis factor- TNF- α) (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (IL-6) را افزایش می دهند. همچنین لیشمانیا ماژور مانع از رها شدن سیتوکروم c از میتو کندری و در نتیجه فعال شدن کاسپاز ۳ ماکروفاژ آلوده می شود. لیشمانیا با این عمل به بقای خود در داخل میزبان کمک می کند (۲۷، ۲۸). میلتهوسین (Miltefosine) در لیشمانیا دونوانی با کاهش نفوذپذیری غشای میتو کندری باعث افزایش رها شدن سیتوکروم c و نهایتاً القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی می شود (۲۹). هنوز مکانیسم دقیق القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی توسط کانتاریدین مشخص نیست. اما مطالعات مختلف نشان داده است که کانتاریدین در سلول های سرطانی با افزایش فشار اکسیداتیو باعث تخریب DNA سلول شده و آن هم مرگ برنامه ریزی شده سلولی را از مسیر میتو کندری با

۳) لیشمانیا ماژور + کانتاریدین ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر



تصویر شماره ۳: نتایج فلوسایتومتری برای پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور پس از مواجهه با کانتاریدین با استفاده از نرم افزار CellQuest (۱)؛ نمونه کنترل، پس از ۷۲ ساعت، (۲) پروماستیگوت مواجهه 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 می دهند که بیشترین غلظت کانتاریدین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) DMSO در پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور پس از ۷۲ ساعت سبب $62.52/33.50$ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی می شود. مقدار مرگ برنامه ریزی شده در ماکروفاژ آلوده و غیر آلوده پس از مواجهه با کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب $43/42$ درصد و $21/35$ درصد می باشد. کانتاریدین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و گذشت ۴۸ ساعت در ماکروفاژ غیر آلوده $23/76$ درصد نکروز می دهد در حالی که غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر $7/27$ درصد نکروز و $34/9$ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی می دهد. مقدار نکروز و مرگ برنامه ریزی شده در ماکروفاژ بدون دارو (به عنوان کنترل) پس از ۴۸ ساعت به ترتیب $1/97$ و $19/06$ درصد بود. بنابراین تنها غلظت پایین کانتاریدین در ماکروفاژهای غیر آلوده باعث مرگ

1. Inhibitory Concentration

از آن جا که لیشمانیا از مرگ برنامه ریزی شده سلولی ماکروفاژ آلوده، جلوگیری می کند و کانتاریدین با قدرت القای مرگ برنامه ریزی 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 پایان نامه دانشجویی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر تأمین هزینه های طرح اعلام می دارند.

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

References

1. Kaur S, Petel H, Sharma V, Garg P, Roy N. Leishmani major structural 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 PP2A α . *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.

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, Fandong 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. Mylbrisphalerlata 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.

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.