

An Overview on Anticancer Drugs with Antileishmanial Activity

Masoud Keighobadi¹,
Javad Akhtari²,
Mahdi Fakhar³,
Saeed Emami⁴,
Hassan Mirzaei⁵

¹ PhD Student in Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Infectious Diseases Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

(Received January 30, 2018; Accepted March 20, 2018)

Abstract

Leishmaniasis is a major public health problem, but so far there are no effective commercially available vaccines for this disease. Its control strategy is only reliant on therapy, but currently the drugs available for the treatment of leishmaniasis are also limited and a great concern is the rapid rate of resistance to common drugs. The first step in discovery and development of new drugs is to identify an appropriate drug target. Accordingly, it is important to recognize the metabolic pathways in which the leishmania parasites live and selecting a target in the parasite biological pathway, absent in the host or different from the host homolog. Discovery of new drugs requires high costs and takes a lot of time (up to 15 years). Therefore, choosing the approved drugs in the market for various diseases, including leishmaniasis is very cost-effective considering the mechanism of drug action and other aspects. Miltefosin is an effective anti-cancer agent that is also used for different types of leishmaniasis. In recent years, researchers have focused on the anti-leishmanial effects of pharmaceutical compounds or anticancer drugs to find more effective compounds with lower side effects. The present article mainly reviews the anticancer drugs that have been tested for their anti-leishmanial effects in both in vitro and in vivo conditions.

Keywords: leishmaniasis, drug targets, anti-cancer drugs

مروری بر داروهای ضد سرطان دارای اثرات ضد لیشمانیایی

مسعود کیقبادی^۱

جواد اختری^۲

مهدی فخار^۳

سعید امامی^۴

حسن میرزایی^۵

چکیده

بیماری لیشمانیوز مشکلی عمده در بهداشت عمومی است و تا به امروز هیچ واکنش موثری که به صورت تجاری در دسترس باشد برای این بیماری کشف نشده است. استراتژی کنترل بیماری تنها متکی به درمان است اما در حال حاضر داروهای موجود برای درمان بیماری محدود است و دغدغه کنونی افزایش مقاومت نسبت به داروهای رایج می باشد. اولین گام در شناسایی داروهای جدید شناسایی یک تارگت دارویی مناسب است. در همین راستا، آگاهی از مسیرهای متابولیسمی که انگل لیشمانیا در چرخه زندگی خود و برای بقا از آن استفاده می کند، ضروری است و نیز انتخاب یک هدف در مسیر بیولوژیکی انگل و قارچ است که در بدن میزبان وجود نداشته باشد و یا متفاوت از ترتیب‌های ژنی میزبان باشد و این نکته مهم را باید در نظر داشت که کشف داروهای جدید مستلزم صرف هزینه‌های بسیار بالا و هم چنین صرف زمان زیادی (تا ۱۵ سال) می باشد. در نتیجه انتخاب داروهای مورد تایید در بازار برای بیماری‌های مختلف از جمله بیماری لیشمانیوز با در نظر گرفتن مکانیزم عمل دارو و جنبه‌های دیگر بسیار مقرون به صرفه می باشد. از طرفی با توجه به این که داروی میلنفوسین (به عنوان یک داروی ضد سرطان) تنها داروی خوراکی موثر جهت درمان انواع لیشمانیوزها می باشد، در سال‌های اخیر محققین با تمرکز روی اثرات ضد لیشمانیایی ترکیبات دارویی و یا داروهای ضد سرطان به دنبال یافتن داروی جایگزین موثرتر و دارای عوارض کم تر می باشند. لذا در این مطالعه، تنها به مرور داروهای ضد سرطان که تا کنون اثرات ضد لیشمانیایی آن‌ها در شرایط درون تنی و برون تنی منتشر شده است می پردازیم.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز، تارگت های دارویی، داروهای ضد سرطان

مقدمه

این بیماری در ۹۸ کشور بومی است و میزان مرگ و میر سالانه آن ۲۰ تا ۳۰ هزار مورد برآورد می شود (۱). انواع لیشمانیوز بروز سالیانه حدود ۷۰۰ هزار تا یک میلیون نفر (مجموع انواع اشکال بیماری) را دارند. از آن جا که واکنش موثر بر این بیماری هنوز در حال مطالعه است.

لیشمانیوز به گروهی از بیماری های انگلی ناشی از حداقل ۲۰ گونه مختلف از انگل لیشمانیا اطلاق می شود که طیف گسترده ای از بیماری شامل ضایعات پوستی ساده تا فرم احشایی را تشکیل می دهد. این انگل از طریق نیش پشه خاکی به انسان و حیوان منتقل می شود.

E-mail: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی دکتری پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه نانوفناوری پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی و گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۱/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

اقدامات کنترلی تنها بر پایه شیمی درمانی است. خط اول درمان استاندارد داروهای آنتی موان پنج ظرفیتی (گلوکانتیم، پنتوستام) هستند اما ظهور مقاومت نسبت به آن‌ها کارآیی شان را محدود کرده است. داروهای جایگزین دیگر شامل آمفوتریسین ب (Amphotericin B)، میلنفوسین (Miltefosine) و پارومومایسین (paromomycin) می‌باشند که در دسترس هستند اما استفاده از آن‌ها یا به دلیل سمیت و یا هزینه‌های بالای درمان محدود است (۲). چالش پیشرو در درمان لیشمانیوزها شامل عدم دسترسی مناسب به دارو، ظهور مقاومت‌های دارویی، سمیت دارویی و مقرون به صرفه نبودن آن‌ها می‌باشد. انتخاب یک هدف در مسیر بیولوژیکی انگل و قارچ است که در بدن میزبان وجود نداشته باشد و یا متفاوت از ترتیب‌های ژنی میزبان باشد و این نکته مهم را باید در نظر داشت که کشف داروهای جدید مستلزم صرف هزینه‌های بسیار بالا و هم چنین صرف زمان زیادی (تا ۱۵ سال) می‌باشد. در نتیجه بررسی داروهای موثر و تارگت‌های دارویی جدید (بر اساس تفاوت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بین انگل لیشمانیا و میزبان) و انتخاب داروهای مورد تایید در بازار برای بیماری‌های مختلف از جمله بیماری لیشمانیوز با در نظر گرفتن مکانیزم عمل دارو و جنبه‌های دیگر بسیار مقرون به صرفه می‌باشد. بنابراین بررسی داروهای موثر و تارگت‌های دارویی جدید (بر اساس تفاوت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بین انگل لیشمانیا و میزبان) برای درمان لیشمانیوز اهمیت فراوانی دارد (۳،۴). باتوجه به این که در بررسی‌های مختلف محققین برخی از داروهای ضد سرطان خواص ضد لیشمانیایی مناسبی از خود نشان داده‌اند و در سال‌های اخیر مطالعه روی این داروها (البته در دوزهای پایین و نه دوزهای مورد استفاده در بیماران سرطانی) افزایش چشمگیری داشته است (۵). از سوی دیگر داروی ضد سرطان میلنفوسین تنها داروی خوارکی ضد لیشمانیا است که مورد تایید اداره غذا و دارو آمریکا می‌باشد (۶،۷). لذا در میان چنین داروهایی، یافتن دارویی

که بیشترین خواص ضدلیشمانیایی و بیشترین شاخص انتخاب (selectivity index) را داشته باشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از مطالعه حاضر، مروری بر داروهای ضدسرطان دارای خواص ضدلیشمانیایی است که تاکنون به صورت درون‌تنی و یا برون‌تنی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

شناسایی تارگت‌های دارویی

یکی از ویژگی‌های مشخص در روند توسعه دارو شناسایی تارگت در یک مسیر بیولوژیکی است. از نظر تئوری، در طی روند شناسایی یک تارگت در یک پاتوژن، نکته مهم این است که تارگت مورد نظر نباید در میزبان وجود داشته باشد و یا از هومولوگ خود در میزبان متفاوت باشد؛ به طوری که بتوان آن را به عنوان یک تارگت دارویی مورد استفاده قرار داد (۴). خصوصیات بیولوژیکی انگل‌های خانواده تری پانوزوماتیده (Trypanosomatidae) مانند جنس لیشمانیا و تری پانوزوما، به‌طور قابل توجهی متفاوت از سلول‌های پستانداران است، بنابراین پیدا کردن تارگت دارویی منحصر به فرد این پاتوژن‌ها امکان‌پذیر می‌باشد. در مرحله دوم، تارگت دارویی انتخاب شده کاملاً باید برای بقای پاتوژن در میزبان خود ضروری باشد. این نکته نیز مهم است که تارگت انتخابی باید قابل سنجش باشد. هم چنین امکانات آزمایشگاهی مناسب و اختصاصی باید برای غربالگری داروها در استفاده از مولکول تارگت در دسترس باشد (۳،۵،۶).

برخی اهداف دارویی بالقوه در لیشمانیا

توپوایزومراز به عنوان تارگت دارویی

DNA توپوایزومراز آنزیمی است که نقش مهمی در سیاری از فرآیندهای ضروری مانند همانندسازی DNA، رونویسی، ترمیم و نوترکیبی دارد. آن‌ها به توپوایزومراز نوع اول و نوع دوم طبقه‌بندی می‌شوند که به ترتیب روی DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای عمل

بیوسنتز فولات

مسیر فولات به عنوان یک تارگت دارویی مورد توجه بوده است و در درمان دارویی به عنوان ضد سرطان و ضد مالاریا استفاده می‌شود. فولات‌ها کوفاکتور مهمی در انواع مسیرهای سوخت و ساز بدن (سنتز و متابولیسم اسید آمینه، سنتز DNA و RNA) هستند. از آن‌جا که آن‌ها برای رشد ضروری هستند، آنزیم‌های درگیر در سنتز آن‌ها به عنوان تارگت دارویی مورد توجه هستند. تیمیدیلات سنتاز و دی هیدروفولات ردوکتاز (تبدیل کننده دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات) از جمله این آنزیم‌ها هستند (۱۱). تیمیدیلات سنتاز و دی هیدروفولات ردوکتاز واکنش‌های پی در پی را در سنتز دزوکسی تیمیدین منو فسفات dTMP کاتالیز می‌کنند، مهار کننده‌های کلاسیک دی هیدروفولات ردوکتاز به تنهایی علیه لیشمانیوز اثری ندارند. لذا ترکیبات یا داروهایی که هر دو آنزیم را بتوانند به صورت بالقوه مهار کنند (داروی متوترکسات) از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۳).

پروتئین کینازها به عنوان یک تارگت دارویی

کینازهای وابسته به Cyclin (CDKs) نقش مهمی در تقسیم سلولی دارد. آن‌ها به عنوان تنظیم کننده غیر طبیعی سلول‌های سرطانی شناخته شده‌اند و در نتیجه به عنوان تارگت دارویی مورد توجه هستند. در انگل لیشمانیا خانواده cdc-2 related kinase (CRK) پتانسیل تارگت دارویی را دارند. آن‌ها همولوگ CDKs هستند و برای تداوم چرخه سلولی ضروری به نظر می‌رسند (۱۲،۳).

دو CDKs مفروض در لیشمانیا مکزیکانا (LmexCRK1 و LmexCRK3) برای اشکال پروماستیگوت انگل ضروری هستند. CRK3 در سراسر چرخه زندگی این گونه لیشمانیا فعال است و هم‌چنین مهار کننده‌های CRK3، رشد و تکثیر آماستیگوت‌ها را در ماکروفازهای صفاقی مهار می‌کنند MAP kinases به عنوان واسطه انتقال سیگنال و تنظیم کننده‌هایی مهم در تمایز و تکثیر

می‌کنند. مهار کننده‌های توپوایزومراز به عنوان تارگتی برای درمان بیماری‌های باکتریایی و انگلی استفاده شده‌اند. توپوایزومراز نوع یک (I) در لیشمانیا دونووانی و تریپانوزوما کروزوی شناسایی شده و این آنزیم به ATP وابسته نمی‌باشد. توپوایزومراز I لیشمانیا دونووانی هم در کینتوپلاست و هم در هسته انگل وجود دارد. داروهای استیوگلوکونات سدیم و استیامین اوره از جمله داروهای ضد لیشمانیایی‌اند که مهار کننده‌های توپوایزومراز I می‌باشند و هم‌چنین کمپتوتسین (Camptothecin)، یک آلکالوئید گیاهی ($C_{20}H_{16}N_2O_4$) و یک مهار کننده توپوایزومراز I در یوکاریوت‌ها شناخته شده است که در تریپانوزوما کروزوی، تریپانوزوما بروسه‌ای و لیشمانیا دونووانی نیز اثر مهاری دارد. آنالوگ camptothecin در برابر تریپانوزوم و ساختار موتیف آن شناسایی شده است که به طور اختصاصی توپوایزومراز I انگل را با قدرت زیادی مهار می‌کند (۸).

توپوایزومراز نوع دو (II) در لیشمانیا دونووانی، تریپانوزوما کروزوی و تریپانوزوما بروسه‌ای شناسایی شده است. جالب توجه است که توپوایزومراز II در تریپانوزوما بروسه‌ای و لیشمانیا دونووانی شامل هر دو فعالیت مستقل و وابسته به ATP است. مهار کننده توپوایزومراز II ، ۹-آیلینوآکریدین (عامل ضد تومور) و سایر مشتقات آکریدین انگل‌های جنس لیشمانیا و تریپانوزوما را به شدت مهار می‌کنند. دی هیدرو بتولینیک اسید (DHBA)، مشتق شده از بتولینیک اسید در برابر هر دو توپوایزومراز I و II لیشمانیا دونووانی فعال است. سه ایزوفلووانوئید، ۸-پرنیل ماکرونولاتول، لی آسپرین H و اسمایرانسین با خاصیت ضد لیشمانیایی شناسایی شده‌اند که فعالیت این ترکیبات در رابطه با DNA کینتوپلاستی (kDNA) و مهار توپوایزومراز II می‌باشد. با این حال، به علت سمیت سلولی پایین استفاده از آن‌ها محدود است. تجزیه و تحلیل ساختاری این آنزیم‌ها ما را قادر به طراحی مهار کننده‌های خاص در برابر لیشمانیا خواهد کرد (۹، ۱۰).

سلولی در سلول‌های یوکاریوتی هستند. تا کنون به تعداد ده MAP کیناز در لیشمانیا مکزیکانا شناسایی شده است که در این میان روی LmxMPK، LmxMCK و LmxMPK9 مطالعات بیش تری صورت گرفته است. موتانت‌های نول LmxMPK9 و LmxMCK در مراحل مختلف چرخه زندگی آماسیت‌گوت‌ها و پروماستیگوت‌ها وجود دارند و در نتیجه، هر دو آن‌ها می‌توانند به عنوان اهداف دارویی مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه موتانت نول LmxMPK، توانایی آلوده کردن ماکروفاژهای صفاقی و تمایز به آماسیت‌گوت را دارد، اما قادر به تکثیر درون واکوئل پارازیتوفروس نیست. این فنوتیپ با تماس دوباره موتانت‌های LmxMPK قابل برگشت است. بنابراین، LmxMPK برای رشد فرم آماسیت‌گوت ضروری است و می‌تواند به عنوان تارگت دارویی استفاده شود (۱۳). در ادامه تعدادی از داروهای مهم ضد سرطان که در درمان لیشمانیوز موثر هستند مورد بررسی قرار می‌گیرند (جدول شماره ۱).

۱- دو کسورویسین

دو کسورویسین یک داروی شناخته شده علیه سلول‌های سرطانی است و مطالعات متعددی اثربخشی ضدسرطانی آن در محیط برون تنی و درون تنی تایید نموده است (۱۴). دو کسورویسین یک آنتی‌بیوتیک آتراسیکلینی است که همانند همه آتراسیکلین‌ها با برهمکنش با DNA عمل مهاری خود را اعمال می‌کند. این دارو فعالیت ضد توموری گسترده‌ای داشته و در درمان

بسیاری از سرطان‌ها از جمله لوکمی حاد، لنفوم‌های هوچکینی و غیر هوچکینی، سرطان‌های پستان و ریه به کار برده می‌شود (۱۵، ۱۶). دو کسورویسین می‌تواند وارد DNA شود و به طور مستقیم روی نسخه برداری و ترجمه اثر بگذارد. یک عمل مهم دو کسورویسین تشکیل کمپلکس سه جزئی با DNA توپوایزومراز II است. هم‌چنین می‌تواند به علت وجود گروه کتون، رادیکال آزاد محلول در بافت نرمال و سرطانی ایجاد کند. این رادیکال‌ها با اکسیژن برای تولید رادیکال سوپراکسید واکنش می‌دهند و می‌توانند پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل تولید کنند که به DNA حمله کنند. در صورت واکنش با آهن این فرایندها به طرز قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابند (۱۶). شکل پیگله (Pegylated) لیپوزومی دو کسورویسین، داکسیل (Doxil) نام دارد که یک فرمولاسیون نانوذره‌ای است و ابعاد زیر ۱۰۰ نانومتر داشته و با مکانیسم EPR (Enhanced permeability and retention effect) در بافت‌های توموری تجمع می‌یابد و از بسیاری از عوارض جانبی دو کسورویسین جلوگیری می‌کند. مولکول‌های دو کسورویسین در مرکز این ساختار نانوذره‌ای رسوب کرده و حالت کریستالی به خود گرفته‌اند. اخیراً داروی داکسیل (با نام تجاری سینادوکسوزوم) در ایران تولید شده و به تولید انبوه رسیده است (۱۶).

Sett و همکاران در سال ۱۹۹۲ اثرات آنتی لیشمانیایی دو کسورویسین را روی لیشمانیا دونسووانی گزارش کردند (۱۷).

جدول شماره ۱: فهرست ترکیبات ضد سرطان دارای فعالیت ضد لیشمانیایی

نام دارو	مکانیسم اثر دارو	برون تنی / درون تنی	انواع گونه‌های لیشمانیا	نویسنده‌گان
دو کسورویسین	برهمکنش با DNA	برون تنی	لیشمانیا مازور (IC ₅₀ =10.49 µg/ml)	(۱۷)Shokri et al-2017
آلیئوتاکریبین‌ها	مهاری DNA توپوایزومراز II	برون تنی	مهاری رشد ۸۰ درصدی لیشمانیا مازور	(۱۸)Maul et al-1993
آنالوگ‌های فسفولیپیدی	مهاری متابولیسم لیپید و تخریب غشای سلول	برون تنی	مهاری فرم پروماستیگوت لیشمانیا دونسووانی در مدت ۴۸ ساعت	(۲۰)Miguel et al-2008
میلفوسین	مهاری فسفوریلاسیون پروسپل پروتئین کیناز	برون تنی و درون تنی (انسان و حیوان)	درمان حدود ۹۰ درصد بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی و احشایی	(۲۲)2006-Losieau
تری‌پوتیل‌تین	مهاری پروتئین کیناز	برون تنی	لیشمانیا تروپیکا (LC ₅₀ = 0.954 µg/ml)	(۲۵)Waseem et al-2017
همپریدین	نامشخص	برون تنی	مهاری رشد آماسیت‌گوت و پروماستیگوت فرم‌های لیشمانیا مازور با شاخص انتخاب برابر با ۲۰	(۲۶)Tanaka et al-2012
۸- هیدروکسی کتولین‌ها	مهاری زنجیره انتقال الکترون	برون تنی	مهاری رشد پروماستیگوت فرم‌های لیشمانیا مازور، اینفانتوم و تروپیکا	(۲۴)2004- Dardari
تاموکسیفن	اختلال در سنتز استیروئید غشای سلول	برون تنی و درون تنی	مهاری رشد لیشمانیا آمازوننسیس	Doroodgar et al-2016
ایبی کبید	القا سنتز سایتوکاین‌های موضعی و آزاد سازی نیتریک اکسید از ماکروفاژ	برون تنی و درون تنی	مهاری رشد لیشمانیا مازور، لیشمانیا دونسووانی	(۲۹،۳۰)Trinconi et al-2016
داکولیب	مهاری کنده آتریم فسفایدیل اینوزیتول تری کیناز	برون تنی و درون تنی	کاهش قابل توجه بار انگلی در موش آلوده به تریانوژوما اما عدم تاثیر روی لیشمانیا مازور	(۲۰)Sing et al-2012
سائیتیب	مهاری کنده تریوزین کیناز	برون تنی و درون تنی	آماسیت‌گوت‌های لیشمانیا مازور، ل. مکزیکانه، ل. آمازوننسیس، ل. دونسووانی و ل. تروپیکا	(۳۴)Patel et al-2014
ایماتینیب	مهاری مسدودکننده سیگنالی وابسته به کیناز	برون تنی و درون تنی	درمان موش‌های آلوده به لیشمانیا آمازوننسیس	(۳۶)Sanderson et al-2014

Kole و همکاران در سال ۱۹۹۹ سینرژسم اینترفرون گاما و لیپوزوم های دو کسورویسین تارگت شده با مانوز را در مدل حیوانی روی لیشمانیوز احشایی بررسی کردند. وجود اینترفرون گاما همراه با شیمی درمانی باعث حذف کامل انگل از طحال شد (۱۸).

در سال ۲۰۱۶ شکر و همکارانش دو داروی دو کسورویسین و داکسیل را روی لیشمانیا ماژور (L) در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار دادند. دو کسورویسین و داکسیل به ترتیب با IC_{50} (غلظت ۵۰ درصدی مهار رشد)، ۱۰/۴۹ و ۹/۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر اثرات خوبی روی اشکال پرو ماستیگوت انگل داشته‌اند و نیز با استفاده از رده سلولی J774 در مقایسه با گلو کانتیم روی اشکال آماستیگوت این انگل هم موثر بوده‌اند (۱۹).

۲- آنیلینوآکریدین‌ها

این دسته از داروهای ضد سرطانی با مهار DNA توپوایزومراز II منجر به جلوگیری از رونویسی و ترجمه DNA می‌شوند. کارآیی آنیلینوآکریدین‌ها در مهار توپوایزومراز سبب شده که این دسته از داروها به عنوان عوامل ضد تک یاخته‌ای استفاده شوند. طی مطالعه‌ای فعالیت یک سری از مشتقات ضد لیشمانیایی ۹- آنیلینوآکریدین روی فرم‌های آماستیگوت و پروماستیگوت L. ماژور بررسی گردید و نتایج نشان داد که این داروها به صورت اختصاصی DNA توپوایزومراز را مهار می‌کنند (۲۰). هم‌چنین مطالعه رابطه ساختمان و فعالیت این ترکیبات نشان داد که حضور گروه‌های الکترون‌دهنده در این مشتقات باعث افزایش کارآیی فعالیت ضد لیشمانیایی شده است.

۳- آنالوگ های فسفولیپیدی

در دهه اخیر آنالوگ‌های فسفولیپیدی به عنوان داروهای پیشرو در درمان لیشمانیوزها در نظر گرفته شده‌اند. این داروها به دو دسته تقسیم می‌شوند:

الف) آلکیل فسفوکولین: در این دسته فسفوکولین با الکل‌های زنجیر بلند و بدون حضور گلیسرول استریفیه می‌شود. از این دسته می‌توان به میلتفوسین اشاره کرد. میلتفوسین تنها داروی خوراکی در دسترس برای درمان لیشمانیوز احشایی می‌باشد. نام شیمیایی این دارو هگزا دیسیل فسفوکولین می‌باشد. از سال ۲۰۰۲ میلادی تا کنون، این دارو در نقاط مختلف جهان برای درمان موارد لیشمانیوز پوستی و احشایی به عنوان خط سوم درمان دارویی استفاده می‌شود. طی مطالعه‌ای در هند کارآیی و ایمنی میلتفوسین برای درمان لیشمانیوز احشایی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که ۹۰/۵ درصد از این افراد بعد از یک دوره شش ماهه بهبود یافتند. در حالی که ۰/۹ درصد این افراد فوت کردند. هم‌چنین نتایج یک مطالعه کوهورت روی ۱۰۱ بیمار مبتلا به این بیماری در هند نشان داد که میلتفوسین بعد از دوره درمان شش ماهه و یک ساله به ترتیب باعث بهبودی ۸۲/۱ و ۷۲/۳ درصد از بیماران می‌گردد (۲۱).

مکانیسم ضد سرطانی میلتفوسین مهار فسفوریلاسیون وابسته به پروتئین کیناز می‌باشد و از آنجایی که این آنزیم در غشای لیشمانیا وجود دارد، تصور می‌شود که این ترکیب بتواند روند بیماری‌زایی لیشمانیوز پوستی را مهار نماید. مطالعات اولیه روی ضایعات پوستی ناشی از L. ماژور نشان داد که این ترکیب می‌تواند باعث بهبود ضایعه گردد. آزمایشات تکمیلی روی لیشمانیا دونووانی حاکی از آن است که این ترکیب می‌تواند ظرف مدت ۴۸ ساعت باعث مهار فرم پروماستیگوت این گونه از انگل گردد (۲۲).

در سال ۲۰۰۶ Ritmeijer و همکارانش در کشور اتیوپی از مجموع ۵۸۹ مردی که مبتلا به بیماری لیشمانیوز احشایی بودند دو داروی میلتفوسین و گلو کانتیم را به صورت خوراکی و تزریقی (داخل عضله) مورد مقایسه و ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که هر دو دارو اثر مشابهی دارند و در بیمارانی (۲۷ نفر) که هم زمان مبتلا

۵- تری بوتیل تین

تری بوتیل تین (tributyltin) یکی از ترکیبات پیشرو برای درمان سرطان می باشد. در طی مطالعه‌ای که انجام شد اثرات بیولوژیک مشتقات این ترکیب به عنوان ضد لیشمانیا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که مشتقات کربوکسیلات تری بوتیل تین دارای سمیت بالایی روی رده سلول سرطانی کبد با IC₅₀ برابر با ۰/۰۸ میکروگرم در میلی لیتر می باشد. هم چنین این مشتقات باعث کشندگی ۹۰ درصدی انگل های لیشمانیا (LC₅₀= 0.078-0.954) می گردند (۲۷).

۶- هسپریدین

هسپریدین (Hesperidin) یک فلاوانون گلایکوزید است که در سال ۱۸۲۸ توسط لیبرتون شیمیدان فرانسوی از لایه داخلی سفید مرکبات استخراج شد (۱۴). تحقیقاتی در مورد اثرات ضدسرطانی هسپریدین صورت گرفته است، اما هنوز به طور کامل مشخص نشده است که هسپریدین این نقش را در مکانیسم های سرطان انسان بتواند انجام دهد (۱۵). تحقیقات مختلفی نشان داده است که هسپریدین می تواند به عنوان یک داروی با اثرات ضدلیشمانیایی مطرح باشد. نتایج تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که هسپریدین باعث مهار رشد آماسیگوت و پروماستیگوت های *L. مازور* با شاخص انتخاب برابر با ۲۰ می گردد. اما در مجموع سمیت آن روی سلول های سرطانی کبد تا حدودی بالا بوده است (۳۰-۲۸).

۷- تاموکسیفن و رالوکسیفن

داروهای تاموکسیفن (Tamoxifen) و رالوکسیفن (Raloxifen) دو داروی ضدسرطان پستان هستند. آزمایشات مختلف روی این دو دارو نشان داده است که می توانند پتانسیل بالایی به عنوان داروهای ضد لیشمانیایی داشته باشند (۳۱). تاموکسیفن می تواند تغییراتی در غشاء انگل ایجاد کند و در نتیجه ستر اسفنگولیپید را مختل می کند اما رالوکسیفن با آسیب به غشای سلولی و میتوکندریایی انگل در حیات انگل لیشمانیا اختلال ایجاد می کند (۳۲). ترکیب

به لیشمانیوز و ایدز بودند، میلتفوسین عوارض جانبی کم تری نسبت به گلوکانتیم بوده و در عین حال اثرات درمانی کم تری از گلوکانتیم داشته است (۲۳).

در مطالعه ای دیگر اثر ترکیبی میلتفوسین و آمبیزوم (AmBisome®) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد اگر چه کارایی آن در درمان لیشمانیوز مورد قبول است اما دارای عوارض جانبی نامطلوبی نیز بوده است. هم چنین میلتفوسین دارای نیمه عمر ۱۵۲ ساعت می باشد که این امر می تواند استفاده از میلتفوسین را در افراد باردار دچار مشکل نماید (۱۲). مکانیسم ضد لیشمانیایی میلتفوسین بدین صورت است که این دارو با تنظیم فعالیت آنزیم آمینوفسفولیپید ترانسلوکاز سبب تجمع دارو در داخل سلول شود ضمن این که میلتفوسین، محتوای لیپید را در غشای پروماستیگوت ها کاهش می دهد که این امر باعث مهار فسفاتیدیل اتانول آمین-ان-متیل ترانسفراز گردیده و در نهایت منجر به کاهش تکثیر انگل ها می شود (۲۴).

ب) آلکیل گلیسرول فسفو کولین: از این دسته می توان به edelfosine اشاره کرد. آنالوگ های فسفولیپیدی شامل imofosine و edelfosine که در مرحله کار آزمایی بالینی درمان سرطان هستند نیز روی لیشمانیا دونووانی و سایر گونه ها موثر هستند. نکته حائز اهمیت این است که آنالوگ های فسفولیپیدی، بیش ترین حساسیت را روی شکل های پروماستیگوت لیشمانیا دونووانی داشته در حالی که این آنالوگ ها اثر مهاری کم تری روی تریپانوزوما برده ای داشته اند (۲۵،۵).

۴- مشتقات ۸-هیدروکسی کینولین

این ترکیبات دارای خصوصیات ضد سرطانی، ضد لیشمانیایی و ضد میکروبی می باشند. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داده است که مشتقی از ۸-هیدروکسی کینولین (تصویر شماره ۱) باعث مهار رشد پروماستیگوت های *L. مازور*، *L. اینفانتوم* و *ل. تروپیکا* می گردد. هم چنین حساسیت پروماستیگوت به ترکیب مزبور تقریباً مشابه آموتریسین ب بوده است (۲۶).

۹- مهارکننده های کیناز

کینازها (فسفو ترانسفرازها) آنزیم هایی هستند که گروه فسفات پرانرژی را از مولکول هایی مانند آدنوزین تری فسفات به سوبستراهای خود انتقال می دهند. آنزیم های کینازی به عنوان کلید کنترلی برای انجام بسیاری از فعالیت های سلولی عمل می کنند و تقریباً در اکثر وظایف فیزیولوژیک بدن نقش مهمی ایفا می کنند.

داکتولیسیب (Dactolisib) از جمله داروهای ضد سرطان می باشد و از مشتقات ایمیدازو کینولین است که باعث مهار آنزیم های فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز وابسته به پستانداران می گردد. طی آزمایشاتی که روی موش های آلوده به انگل *تریپانوزوما* انجام گرفت مشخص گردید که داروی مزبور باعث کاهش قابل توجه بار انگلی در بدن موش شده است. اما چندان اثری روی *ل. مائور* نداشته است که این امر می تواند به دلیل عدم توانایی ورود دارو به انگل باشد (۲۲).

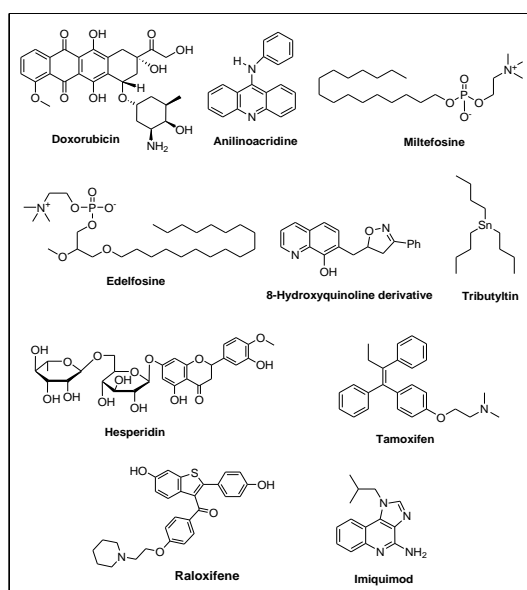
داروهای Lapatinib و Sunitinib, Sorafenib که از جمله داروهای مهار کننده تیروزین کینازی می باشند به صورت برون تنی و درون تنی روی آماسیگوت های *ل. مائور*، *ل. مکزیکانا*، *ل. آمازونسیس*، *ل. دونوانی* و *ل. تروپیکا* موثر بوده اند و نیز به صورت خوراکی در موش مبتلا به عفونت *ل. دونوانی* باعث کاهش بار انگلی در کبد شده اند (۲۱-۲۳).

ایماتینیب (Imatinib) یک داروی شیمی درمانی است که برای درمان سرطان استفاده می شود. این دارو مشتقی از ۲-فنیل آمینو پیریمیدین است که به عنوان مهارکننده تعدادی از آنزیم های تیروزین کیناز می باشد و در درمان انواع سرطان ها استفاده می شود و به طور خاص، آن را برای درمان لوسمی مزمن میلوئیدی (CML) و لوسمی حاد لنفوسیتی (ALL) به کار می برند. طی مطالعه ای تعدادی از موش های آلوده به *ل. آمازونسیس* را به صورت خوراکی تحت درمان ایماتینیب قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که این دارو مسیرهای سیگنالی وابسته به کیناز را مهار کرده است،

داروهای تاموکسیفن و میلتفوسین نیز برای درمان بیماری لیشمانیوز به صورت برون تنی و درون تنی مورد آزمایش قرار گرفت که نشان داد این ترکیب می تواند به غشای طور موثری باعث مهار رشد لیشمانیا *آمازونسیس* گردد (۳۲، ۳۳).

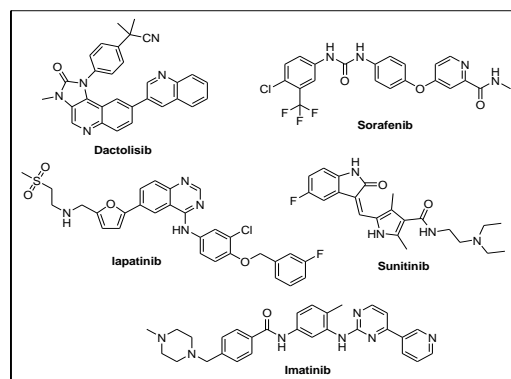
۸- ایمی کیمود

ایمی کیمود (Imiquimod) برای درمان زگیل های ناحیه تناسلی و کارسینوما به کار می رود. در سال ۲۰۰۱ Arevalo و همکارانش با استفاده از ترکیب داروهای ایمی کیمود و گلوکانتیم در بین ۱۲ بیمار مقاوم به درمان لیشمانیوز پوستی بعد از پی گیری شش ماهه بهبودی ۹۰ درصدی را در بیماران گزارش کردند (۳۴). سپس آزمایشات تکمیلی در شرایط برون تنی و درون تنی بهبودی بیش تری را در درمان لیشمانیوز پوستی نشان دادند (۳۵، ۳۶). طی مطالعه جداگانه دیگری با ترکیب داروی ایمی کیمود و S-28463 در شرایط برون تنی و درون تنی مشاهده شد که ترکیب مذکور با القای سنتز سایتوکاین های موضعی و هم چنین آزادسازی نیتریک اکسید و تحریک عمل سیگنالینگ در ماکروفاژها باعث بهبودی لیشمانیوز در مدل تجربی می گردد (۳۷). مطالعات بسیار دیگری هم در این زمینه انجام شده است که اثرات مثبت این ترکیب را تایید می کند (۳۸-۴۰).



تصویر شماره ۱: برخی داروهای ضد سرطان دارای اثرات ضد لیشمانیایی

بنابراین می‌تواند به عنوان یک هدف بالقوه درمانی برای بیماری لیشمانیوز مطرح گردد (تصویر شماره ۲) (۴۱-۴۴).



تصویر شماره ۲: برخی داروهای ضد سرطان مهارکننده کیناز با اثرات ضد لیشمانیایی

برای دستیابی به نتایج موفقیت آمیز در درمان این بیماری، شناخت دقیق مسیرهای متابولیک منحصر به فرد انگل لیشمانیا (مانند مسیر گلیکولیتیک، بیوسنتز استرول و غیره) و به طور کلی آشنایی با بیوشیمی و فیزیولوژی این انگل، بسیار مهم و ضروری است. شناخت مسیرهای مذکور و یافتن تارگت دارویی مناسب به عنوان پاشنه آشیل این انگل می‌تواند مسیر درمان دارویی را هموارتر

کند. مطالعه مروری حاضر نشان داد که طیف وسیعی از داروهای ضدسرطان دارای اثرات ضد لیشمانیایی هستند و با توجه به آن که بسیاری از این مطالعات ناقص هستند و مراحل درون تنی را در برنگرفته و یا وارد مراحل کارآزمایی بالینی نشده اند، تصمیم در مورد اثربخشی مطمئن هر کدام کار نسبتاً مشکلی است. به هر حال در کنار بررسی سایر ترکیبات ضد سرطان روی لیشمانیا، بسیاری از آنالوگ های دارویی هم در حال مطالعه بوده و امید بخش درمان دارویی مناسب و اقتصادی در آینده نزدیک می‌باشند. در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که از میان دوازده داروی فهرست شده در جدول شماره ۱، داروهایی که در شرایط درون تنی (مدل‌های حیوانی) نیز اثرات ضد لیشمانیایی آن‌ها به اثبات رسیده است و دارای شاخص انتخاب قابل قبولی بودند، شامل تاموکسیفن و رالوکسیفن، ایمیکمود (Imiquimod) و ایماتینیب (Imatinib) و سانیترینیب (Sunitinib) کاندیدهای مناسبی برای انجام مطالعات بیش‌تر در خصوص یافتن داروی موثرتر و دارای عوارض کم‌تر برای درمان بیماری لیشمانیوز در آینده می‌باشند.

References

1. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Fact Sheet. 2016; 375. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Accessed 23 August 2016.
2. Fakhari M, Mohebbi M, Ahmadpoor E. Visceral Leishmaniasis (kala-azar). 1thed. Gorgan, Iran: Nouroozi Pub; 2014 (Persian).
3. Chawla B, Madhubala R. Drug targets in Leishmania. J Parasit Dis 2010; 34(1): 1-13.
4. Emami S, Tavangar P, Keighobadi M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. Eur J Med Chem 2017; 135: 241-259.
5. Perez JM, Fuertes MA, Nguewa PA, Castilla J, Alonso C. Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives. Curr Med Chem 2008; 15(5): 433-439.
6. Teymouri M, Badiee A, Golmohammadzadeh S, Sadri K, Akhtari J, Mellat M, et al. Tat peptide and hexadecylphosphocholine introduction into pegylated liposomal doxorubicin: An in vitro and in vivo study on drug cellular delivery, release, biodistribution and antitumor activity. Int J Pharm 2016; 511(1): 236-244.
7. Keighobadi M, Fakhari M, Emami S. Hypothesis: the potential application of doxorubicin against cutaneous leishmaniasis. Trop Parasitol 2015; 5(1): 69-70.

8. Chowdhury AR, Mandal S, Goswami A, Ghosh M, Mandal L, Chakraborty D, et al. Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanial therapy. *Mol Med* 2003; 9(1-2): 26-36.
9. Das A, Dasgupta A, Sengupta T, Majumder HK. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends Parasitol* 2004; 20(8): 381-387.
10. Das A, Dasgupta A, Sharma S, Ghosh M, Sengupta T, Bandopadhyay S, et al. Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 1844-1851.
11. Nare B, Luba J, Hardy LW, Beverley S. New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. *Parasitology* 1997; 114(7): 101-110.
12. Wiese M, Kuhn D, Grünfelder CG. Protein kinase involved in flagellar-length control. *Eukaryot Cell* 2003; 2(4): 769-777.
13. Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 2005; 55(5): 1606-1615.
14. Blum RH, Carter SK. Adriamycin: a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Int Med* 1974; 80(2): 249-259.
15. Lown JW. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacology Ther* 1993; 60(2): 185-214.
16. Akhtari J, Rezayat SM, Teymouri M, Alavizadeh SH, Gheybi F, Badiie A, et al. Targeting, bio distributive and tumor growth inhibiting characterization of anti-HER2 affibody coupling to liposomal doxorubicin using BALB/c mice bearing TUBO tumors. *Int J Pharm* 2016; 505(1-2): 89-95.
17. Sett R, Basu N, Ghosh AK, Das PK. Potential of doxorubicin as an antileishmanial agent. *J Parasitol* 1992: 350-354.
18. Kole L, Das L, Das PK. Synergistic effect of interferon- γ and mannosylated liposome-incorporated doxorubicin in the therapy of experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1999; 180(3): 811-820.
19. Shokri A, Akhtari J, Keighobadi M, Fakhari M, Teshnizi SH, Emami S, et al. Promising antileishmanial effectiveness of doxorubicin and Doxil against *Leishmania major*: an in vitro assay. *Asian Pac J Trop Med* 2017; 10(6): 544-548.
20. Mael J, Denny W, Gamage S, Ransijn A, Wojcik S, Figgitt D, et al. 9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(5): 991-996.
21. Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis* 2012; 55(4): 543-550.
22. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(6): 485-497.
23. Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G, et al. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clin Infect Dis* 2006; 43(3): 357-364.

24. Loiseau PM, Bories C. Mechanisms of drug action and drug resistance in Leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Curr Top Med Chem* 2006; 6(5): 539-550.
25. Keighobadi M, Mirzaei H, Fakhar M, Emami S. Current application of arylazoles and annulated azoles in the design of new antileishmanial agents. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(153): 175-190 (Persian).
26. Dardari Z, Lemrani M, Bahloul A, Sebban A, Hassar M, Kitane S, et al. Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinoline derivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino) methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study. *Farmaco* 2004; 59(3): 195-199.
27. Waseem D, Butt AF, Haq I-u, Bhatti MH, Khan GM. Carboxylate derivatives of tributyltin (IV) complexes as anticancer and antileishmanial agents. *DARU* 2017; 25(1): 8.
28. Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M, Kuno T. Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of β -cryptoxanthin and hesperidin. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 516981.
29. Dakshini K, Inderjit. Hesperetin 7-rutinoside (hesperidin) and taxifolin 3-arabinoside as germination and growth inhibitors in soils associated with the weed, *Pluchea lanceolata* (DC) CB Clarke (Asteraceae). *J Chem Ecol* 1991; 17(8): 1585-1591.
30. Virginia DV, Owen H, Poapolathep A, Mario G. Natural substances as new potential strategies for the treatment of Leishmaniosis in Dogs. *Am J Anim Vet Sci* 2017; 12(3): 169-175.
31. Reimão JQ, Uliana SR. Tamoxifen alters cell membrane properties in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology Open* 2018; e6: 1-6.
32. Doroodgar M, Delavari M, Doroodgar M, Abbasi A, Taherian AA, Doroodgar A. Tamoxifen induces apoptosis of *Leishmania major* promastigotes in vitro. *Korean J Parasitol* 2016; 54(1): 9-14.
33. Trinconi CT, Reimão JQ, Coelho AC, Uliana SR. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(5): 1314-1322.
34. Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng T-C, Najjar E, Alvarez E, et al. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis* 2001; 33(11): 1847-1851.
35. Miranda-Verastegui C, Llanos-Cuentas A, Arevalo I, Ward B, Matlashewski G. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2005; 40(10): 1395-1403.
36. Arevalo I, Tulliano G, Quispe A, Spaeth G, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A, et al. Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2007; 44(12): 1549-1554.
37. Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis* 1999; 179(6): 1485-1494.
38. Taylor LA, Gormley R, Kovarik C. *Leishmania tropica*: Combined debulking and imiquimod for the treatment of nonresponsive cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76(1): e13-e14.

39. Hanna E, Abadi R, Abbas O. Imiquimod in dermatology: an overview. *Int J Dermatol* 2016; 55(8): 831-844.
40. Espana RR, Pallares JT, Mateos EA, Suarez BP, Martinez LA, Rodenas JM, et al. Topical imiquimod for cutaneous leishmania in the face of a child: Is it a useful treatment? *J Am Acad Dermatol* 2016; 74(5): AB15.
41. Patel G, Roncal NE, Lee PJ, Leed SE, Erath J, Rodriguez A, et al. Repurposing human Aurora kinase inhibitors as leads for anti-protozoan drug discovery. *Med Chem Comm* 2014; 5(5): 655-658.
42. De Muylder G, Ang KK, Chen S, Arkin MR, Engel JC, McKerrow JH. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2011; 5(7): e1253.
43. Sanderson L, Yardley V, Croft SL. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against *Leishmania* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014; 69(7): 1888-1891.
44. Wetzel DM, McMahon-Pratt D, Koleske AJ. The Abl and Arg kinases mediate distinct modes of phagocytosis and are required for maximal *Leishmania* infection. *Mol Cell Biol* 2012; 32(15): 3176-3186.