

Kinetoplast DNA: A Promising Drug Target for Treatment of Leishmaniasis

Elham Kialashaki¹,
Mahdi Fakhar²,
Javad Akhtari³,
Roghiyeh Faridnia¹,
Masoud Keighobadi⁴

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

² Associate Professor, Department of Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Iranian National Registry Center for Lophomoniasis (INRCL), Mazandaran Branch, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Medical Nanotechnology, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Toxoplasmosis Research Center, Iranian National Registry Center for Hydatid Cyst, Mazandaran Branch, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 8, 2019 ; Accepted April 5, 2020)

Abstract

Leishmaniasis is a vector-borne zoonotic disease caused by various species of the genus *Leishmania*, (trypanosomatidae family) that is transmitted by phlebotomine sandflies. The disease can present in a range of clinical forms, including dermal lesions, metastasis mucocutaneous forms, and fatal visceral forms. In this non-systematic review, we aimed at introducing the role of kinetoplast DNA (kDNA) and dependent topoisomerases (TPI) as potential chemotherapeutic targets for treatment of leishmaniasis. The *Leishmania* parasite has a mitochondrial DNA located in the attached circles. KDNA replication process is very complex and a large number of proteins are involved. Some of them are classified as topoisomerases, which play major biological roles in the effective cell processes in the topology, synthesis, and organization of kDNA and constitute the main drug target in kinetoplast for leishmaniasis cure. Several studies have shown that the inhibitors of TPI exchange these enzymes into intracellular cell toxins and provide an appropriate tool for killing the parasite in the host. DNA binding drugs have also been reported as therapeutic agents against leishmanial infections.

Keywords: *Leishmania*, kinetoplast, DNA topoisomerase, drug target

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (184): 179-193 (Persian).

* **Corresponding Author:** Masoud Keighobadi - Toxoplasmosis Research Center, Iranian National Registry Center for Hydatid Cyst, Mazandaran Branch, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: keighobadi216@yahoo.com)

DNA کینتوپلاستی: یک هدف دارویی امیدبخش در درمان بیماری لیشمانیوز

الهام کیا لاشکی¹
مهدی فخار²
جواد اختری³
رقیه فریدنیا¹
مسعود کیقبادی⁴

چکیده

لیشمانیوز یک بیماری منتقله از پشه خاکی فلو تومینه است که عامل آن گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا (خانواده تریانوزوماتیده) می‌باشد. از اشکال مختلف بیماری می‌توان فرم پوستی خوش خیم، فرم پوستی - مخاطی متاستاز دهنده تا فرم احشایی را نام برد. در این مطالعه مروری غیر نظام‌مند به معرفی نقش DNA کینتوپلاستی (kDNA) و توپوایزومرازهای وابسته به آن به عنوان تارگت دارویی جهت درمان عفونت‌های لیشمانیایی پرداخته شده است. این انگل‌ها دارای یک DNA میتوکندریایی می‌باشند که در حلقه‌های به هم متصل شده قرار دارند. فرایند همانندسازی kDNA بسیار پیچیده است و تعداد زیادی پروتئین در آن شرکت می‌کنند. بعضی از آن‌ها به عنوان توپوایزومرازها دسته‌بندی شده‌اند که نقش‌های مهم بیولوژیکی خود را در فرایندهای سلولی مؤثر در توپولوژی، سنتز و سازماندهی DNA داخل سلولی ایفا می‌کنند و به عنوان یک تارگت دارویی مهم در کینتوپلاست جهت درمان شیمیایی لیشمانیوز دخالت می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده است که مهارکننده‌های توپوایزومرازها، این آنزیم‌ها را به توکسین‌های داخل سلولی و یک ابزار مناسب برای کشتن انگل در میزبان تبدیل می‌کنند. همچنین داروهای متصل شونده به DNA به عنوان عوامل درمانی عفونت‌های لیشمانیایی گزارش شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا، کینتوپلاست، DNA توپوایزومراز، تارگت دارویی

مقدمه

طبقه‌بندی جدید برای انگل لیشمانیا ارائه شده است که گونه‌های لیشمانیا را به دو رده‌ی فیلوژنی بزرگ به نام گروه یولیشمانیا و پارالیشمانیا تقسیم می‌کند. با توجه به این طبقه‌بندی، 53 گونه شناسایی شد که از این تعداد، 29 گونه در دنیای قدیم، 20 گونه در دنیای جدید، 3 گونه در هر دو دنیای جدید و قدیم و یک گونه در استرالیا مشاهده شد. در میان این گونه‌های شناسایی شده، 20 گونه در انسان ایجاد بیماری می‌کنند (4).

سازمان جهانی بهداشت، لیشمانیوز را در ردیف ششم بیماری‌های مهم عفونی مناطق گرمسیری دنیا معرفی کرده است. این بیماری به سه شکل عمده جلدی، جلدی مخاطی و احشایی در انسان دیده می‌شود و از شایع‌ترین بیماری‌های مورد غفلت قرار گرفته در مناطق گرمسیری است (1-3).

عامل این بیماری، تک‌یاخته لیشمانیا از خانواده تریانوزوماتیده و راسته کینتوپلاستیدا است. اخیراً یک

مؤلف مسئول: مسعود کیقبادی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح‌آباد، مجمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز
E-mail: keighobadi216@yahoo.com

1. دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. دانشیار، گروه انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، مرکز ثبت ملی لوفومونیاژیس شاخه مازندران، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. دانشیار، گروه نانوفناوری پزشکی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. استادیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، مرکز ثبت ملی کیست هیداتیک شاخه مازندران، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1398/7/16 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/7/21 تاریخ تصویب: 1399/1/17

انسان از طریق نیش پشه خاکی ماده به لیشمانیا مبتلا می شود. پشه خاکی معمولاً در مناطق جنگلی، غارها و لانه جوندگان کوچک زندگی می کند. در حال حاضر 12 میلیون نفر مبتلا به لیشمانیا در دنیا وجود دارند. سالانه 2 میلیون مورد جدید بیماری گزارش می شود که نیم میلیون نفر مبتلا به لیشمانیوز احشایی و 1/5 میلیون نفر مبتلا به لیشمانیوز جلدی می باشند. این بیماری بار اقتصادی سنگینی بر خانواده ها، جوامع و کشورها خصوصاً کشورهای در حال توسعه تحمیل می کند (1). آنتی موآن های پنج ظرفیتی، خط اول درمان انتخابی برای هر دو نوع لیشمانیوز احشایی و جلدی در بسیاری از نقاط جهان هستند، اما به علت بروز مقاومت دارویی، استفاده از آن ها محدود شده است. از جمله مشکلات و عوارض جانبی داروی گلوکانتیم، دردهای عضلانی، بی اشتهایی، حالت تهوع، دردهای شکمی، سرفه، احساس خستگی و بی حالی، نامنظم شدن ضربان قلب و مشکلات کلیوی می باشد. این دارو در دوران شیردهی و در افراد با مشکلات قلبی، کبدی یا کلیوی منع مصرف دارد (1). داروهای جایگزین مانند آمفوتریسین B (Amphotericin B)، میلتفوسین (Miltefosine) و پارامومایسین (Paromomycin) به عنوان خط دوم درمان دارویی لیشمانیوز مطرح هستند، ولی به دلیل سمیت و قیمت بالا، مصرف آن ها نیز محدود شده است (5،6). یکی از ضروریات اجتناب ناپذیر در توسعه داروها، شناسایی تارگت (هدف) مناسب در مسیر فعالیت های منجر به حیات یک موجود زنده (شامل مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک) است. از نظر تئوری، در طی روند شناسایی یک تارگت در یک عامل بیماریزا، نکته مهم این است که هدف مورد نظر در بدن انسان وجود نداشته باشد و یا از هومولوگ خود در بدن انسان متفاوت باشد. با توجه به این که ساختار انگل های لیشمانیا که جز یوکاریوت های تک یاخته ای هستند، به طور قابل توجهی متفاوت از سلول های پستانداران است و بنابراین پیدا کردن تارگت دارویی انحصاری این تک یاخته بیماریزا دست یافتنی است. از سوی دیگر، تارگت دارویی انتخاب

شده کاملاً باید برای بقای عامل بیماریزا ضروری باشد. به طور مثال، اگر پروتئین، هدف یک آنزیم است، مهار آن باید به از دست دادن حیات سلول منجر شود. نکته مهم آخر این که که تارگت انتخابی باید با ابزارها و روش های مختلف آزمایشگاهی مختلف قابل شناسایی و ارزیابی باشد (7). اهداف دارویی مختلفی در انگل لیشمانیا شناسایی، معرفی و ارزیابی شدند که از مهم ترین آن ها می توان به مسیرهای بیوشیمیایی مهم در چرخه زندگی انگل از جمله مسیر گلیکولیز (هدف داروی گلوکانتیم)، بیوسنتز استرول (هدف داروهای آزولی) و پروتئین کینازها (هدف داروی میلتفوسین) و توپوایزومرازها (اهداف داروی پنتوستام و برخی داروهای ضد سرطان دارای اثرات ضد لیشمانیایی مانند دوکسوروبیسین) اشاره نمود (5،7). با توجه به این که، امروزه درمان لیشمانیازیس به یک معضل بهداشتی جهانی تبدیل شده است، شناسایی داروهای جدید و مؤثر به منظور جایگزینی یا مکمل درمان امروزی مهم می باشد. توپوایزومرازها، آنزیم هایی هستند که در متابولیسم DNA کینتوپلاستی (kDNA) نقش دارند و از طرفی میزبان این انگل (انسان و حیوانات) این نوع DNA را ندارند، بنابراین kDNA و توپوایزومرازها می توانند تارگت های دارویی مناسبی برای درمان عفونت های تریپانوزوماتیدی از جمله عفونت های لیشمانیایی باشند (7). در مطالعه مروری حاضر درباره ی نقش kDNA و توپوایزومرازهای وابسته به آن به عنوان تارگت دارویی جهت درمان عفونت های لیشمانیایی شناخته شده، بررسی می شود.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع مروری غیر نظام مند است. مقالات مورد استفاده از پایگاه های اطلاعاتی قابل دسترسی نظیر Magiran، Irandoc، (SID) IranMedex، Scientific Information Database، SienceDirect، PubMed، Google Scholar و در محدوده ی زمانی 1987 تا 2019 گردآوری شدند.

کلیدواژه‌های جستجو شامل لیشمانیا، DNA توپوایزومرازها، کینتوپلاست که این کلمات به تنهایی و یا این که به صورت ترکیبی مورد استفاده قرار گرفتند.

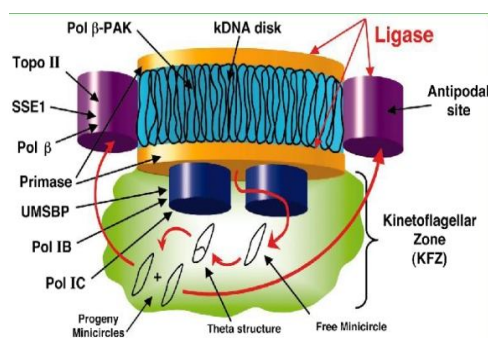
ساختار DNA کینتوپلاستی و نقش آن

جنس لیشمانیا همانند سایر اعضای راسته کینتوپلاستیدا مثل تریپانوزوما دارای ویژگی منحصر به فردی هستند. آن‌ها علاوه بر DNA هسته‌ای، kDNA نیز دارند که در کینتوپلاست این ارگانیسم‌ها قرار دارد. در واقع kDNA، DNA میتوکندریایی انگل‌های راسته کینتوپلاستیدا بوده و 10 تا 20 درصد کل DNA انگل را شامل می‌شود. kDNA شبکه‌ای از DNA حلقوی است که به دو دسته، حلقه‌های بزرگ هموزن (25-50 مولکول با طول 20 هزار جفت باز) و حلقه‌های کوچک هتروژن (تقریباً به طول 0/8 کیلو جفت باز) تقسیم می‌شود و تقریباً 10^4 کپی از آن در هر سلول وجود دارد. حلقه‌های بزرگ، قسمت عملکردی DNA میتوکندریایی است و نقش آن در ویرایش اوراسیل اضافی موجود در نوکلئوتیدهای mRNA به اثبات رسیده است. حلقه‌های کوچک در کدگذاری RNA های راهنما به منظور ویرایش زیر واحد سوم mRNA اکسیداز سیتوپلاسم نقش دارند. همچنین استیو و سیمپسون (1999) (10) یافته‌هایی را در مورد ناحیه متغیر یکی از توالی‌های حلقه‌های کوچک لیشمانیا دنووانی شرح داده‌اند که نسخه برداری و ترجمه آن منجر به تولید یک پروتئین شده است. در تمام انواع لیشمانیا، حلقه‌های کوچک دارای یک قسمت ثابت با طول تقریبی 100-200 جفت باز می‌باشند و بقیه ساختمان را قسمت متغیر تشکیل می‌دهد که در گونه‌های مختلف لیشمانیا، ردیف‌های باز آلی متفاوت بوده و می‌تواند در تشخیص گونه به کار رود. حلقه‌های بزرگ مانند DNA میتوکندریایی در سلول‌های پستانداران و نیز قارچ‌ها، انواع RNA ریوزومی و نیز برخی پروتئین‌های ضروری جهت فعالیت‌های بیوانرژی میتوکندری را کد می‌کنند. حلقه‌های بزرگ از نظر ساختمان و خواص ژنتیک شبیه به DNA میتوکندریایی سایر یوکاریوت‌ها می‌باشند. بعضی

RNA های رونویسی شده از حلقه‌های بزرگ پس از نسخه‌برداری دچار تغییرات می‌شوند که این تغییرات به صورت واردسازی یا حذف یوریدین اضافی می‌باشد که جهت تشکیل اسکلتی با خاصیت قابل خوانده شدن می‌شود که این فرایند را RNA-editing می‌نامند. چگونگی و مختصات این فرایند توسط gRNA مشخص می‌گردد. gRNA توسط حلقه‌های کوچک کدگذاری می‌شود (8-11).

مراحل همانندسازی kDNA

امروزه الگوی همانندسازی kDNA در جنس لیشمانیا، گونه‌های لیشمانیا تارنتولا و لیشمانیا دنووانی می‌باشند. البته روش تکثیر kDNA در لیشمانیا با سایر جنس‌های تریپانوزوماتیده مانند کریتیدیا فاسیکولاتا، تریپانوزوما بروسی و تریپانوزوما کروزی تفاوت چندانی ندارد. در طول این پروسه، تعداد حلقه‌های بزرگ و حلقه‌های کوچک دو برابر شده و به‌طور مساوی در سلول‌های دختر توزیع می‌شود. در فرایند تکثیر، حلقه‌های کوچک به صورت تکی توسط آنزیم‌های توپوایزومراز II از شبکه kDNA آزاد شده و به منطقه کینتوفلاژلار (KFZ) وارد می‌شوند که بین دیسک kDNA و بازالبادی قرار دارد. در این منطقه تخصیص یافته، پروتئین‌هایی وجود دارند که در شروع تکثیر حلقه‌های کوچک نقش دارند مانند پروتئین‌های متصل شونده به توالی عمومی حلقه‌های کوچک (UXSBP)، پرایماز و DNA پلیماز (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: تصویر شماتیک ساختمان کینتوپلاست و پروتئین‌های وابسته به آن (15)

UXSBP به توالی از حلقه‌های کوچک که مسئول شروع تکثیر است، متصل می‌شود و تکثیر رخ می‌دهد. حضور پرایماز و DNA پلیماز نیز الزامی است.

حلقه‌های کوچک آزاد به عنوان واسطه نوع θ تکثیر یافته و از KFZ به 180 درجه مخالف کینتوپلاست مهاجرت می‌کنند. در مکان‌های مخالف، پرایمرها به وسیله اندونوکلاز ویژه (SSEI) آزاد شده و فضای خالی ایجاد شده در پروسه تکثیر توسط DNA پلیماز β پر می‌گردد. حلقه‌های کوچک تازه تکثیر شده توسط آنزیم‌های توپوایزومراز II به آنتی پودال سایت یا محیط شبکه متصل می‌شوند. بعد از تکثیر، حلقه‌های کوچک حداقل دارای یک شکاف هستند و تا زمانی که همه حلقه‌ها تکثیر یابند، باز می‌مانند. حلقه‌های تازه تکثیر شده به طور سازماندهی شده‌ای در طول شبکه kDNA توسط نوسان و یا چرخش کینتوپلاست در ارتباط با سایت‌های آنتی پودال تقسیم می‌شوند. برش kDNA مضاعف قبل از ساتوکنیز رخ داده و دارای یک توپوایزومراز II برای تولید 2 شبکه مساوی در هر سلول دختر است. در مورد تکثیر حلقه‌های بزرگ، اطلاعات کمی در دست است، البته برخلاف حلقه‌های کوچک، آن‌ها از شبکه‌ی kDNA آزاد نمی‌شوند تا حلقه‌های جدید بسازند و به طور معکوس به دیسک متصل هستند (12-14).

DNA توپوایزومرازها

DNA توپوایزومرازها، آنزیم‌هایی هستند که نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای ضروری مانند همانندسازی DNA، رونویسی، ترمیم و بازنویسی دارند. آن‌ها به توپوایزومراز نوع اول و نوع دوم طبقه‌بندی می‌شوند که به ترتیب به DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای می‌چسبند. توپوایزومرازها به عنوان اهداف دارویی در درمان بیماری‌های باکتریایی و انگلی به کار می‌روند (15، 16).

این آنزیم‌ها با ایجاد تغییرات توپولوژیکی و فضایی در DNA دو رشته‌ای نقش مهمی در تنظیم ماهیت دینامیک این مولکول دارند. همچنین توپوایزومرازها با

الحاق یا برداشت مولکول‌های حلقوی DNA در کنترل پروسه‌های بیولوژیکی مهم ایفای نقش می‌کنند. این عملکردها، به طور عمده به متابولیسم اسیدنوکلئیک مانند نسخه‌برداری، رونویسی، بازنویسی و ویرایش بستگی دارد. به عبارتی دیگر، DNA در فضا می‌تواند بر روی خودش تاب بخورد و خم شود و در نتیجه توپولوژی آن تغییر کند که نتیجه‌ی آن ایجاد سوپرکویل‌های مثبت و منفی می‌باشد. باز شدن پیچ‌های DNA در یک ناحیه از مارپیچ DNA که دو انتهای آن فیکس شده‌اند، باعث ایجاد استرسی می‌شود که با سوپرکویل شدن آزاد می‌شود. آنزیم‌هایی که توپولوژی DNA را در چندین مرحله‌ی مختلف در همانندسازی و دیگر فعالیت‌های سلولی، در یوکاریوت‌ها و هم در پروکاریوت‌ها کنترل می‌کنند، توپوایزومراز نامیده می‌شوند (16).

همه DNA توپوایزومرازها دارای 2 ویژگی معمول هستند؛ اول توانایی ایجاد شکاف‌های قابل برگشت در DNA با شکستن پیوند فسفودی استری DNA و توانایی تشکیل دوباره پیوند می‌باشد. در طول این پروسه، یک گروه تیروزینی در آنزیم با پیوند کووالانسی به گروه فسفریل DNA متصل می‌شود. دوم این که وقتی فرم حد واسطه توپوایزومراز -DNA تشکیل می‌شود، آنزیم به جدا شدن انتهای DNA کمک می‌کند و فضایی برای عبور DNA دو رشته‌ای و یا تک‌رشته‌ای دیگر ایجاد می‌کند. بعد از عبور DNA، آنزیم آزاد می‌شود و DNA تنظیم می‌گردد (17). از آنجایی که DNA توپوایزومرازها دارای نقش‌های کلیدی در فرایندهای بیولوژیکی، توپولوژی و سازمان‌دهی DNA هستند، تعیین پایه مولکولی نقش و فعالیت فیزیولوژیک آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد.

انواع DNA توپوایزومرازها

به طور معمول DNA توپوایزومرازها در نوع IA، IB، IIA و IIB دسته‌بندی می‌شوند (جدول شماره 1). نوع I، توپولوژی DNA را با ایجاد شکاف در یک رشته تغییر می‌دهد. درواقع یک رشته DNA را می‌شکند و

رشته دیگر را از آن عبور می‌دهد؛ یعنی سوپر کویل منفی را به DNA شل یا relaxed DNA تبدیل می‌کند. در یوکاریوت‌ها توپوایزومراز نوع I روی هر دو نوع Negative و Positive کار می‌کند و نهایتاً فرم ریلکس مشاهده می‌شود.

آنزیم نوع IA شامل توپوایزومرازهای تایپ III و I در یوباکترها، قارچ‌ها و پستانداران و reverse ژیرازها در یوباکترها و ارکی‌ها می‌باشد. این آنزیم‌ها به انتهای 5 فسفات DNA متصل می‌شوند. فعالیت کاتالایزیک آن‌ها به وسیله منیزیم و پلی کاتیون‌ها تحریک می‌شود. توپوایزومرازهای نوع IA تنها سوپر کویل‌های منفی DNA و سوپر کویل‌های ایجاد شده پس از رونویسی را حذف می‌کنند. آنزیم نوع IB که به انتهای 3 فسفات DNA متصل می‌شود در یوباکترها، یوکاریوت‌ها و ویروس واکسینا یافت می‌شود. توپوایزومرازهای نوع II سوپر کویل مثبت را به منفی تبدیل می‌کند. یعنی به منظور باز کردن پیچ‌های اضافی، دو رشته‌ی DNA را قطع می‌کند و سپس آن‌ها را به هم متصل می‌کند. پس از آن، سوپر کویل منفی توسط آنزیم نوع I به relaxed DNA تبدیل می‌شود. در واقع این آنزیم‌ها با شکستن و بستن دو رشته DNA، توپولوژی DNA را تغییر می‌دهند. در طول این فرایند، هر زیر واحدی از آنزیم با پیوند کووالانسی (پیوند فسفوتیروزی) به انتهای 5 DNA متصل می‌شود. شکاف و گسستگی DNA دو رشته‌ای، یک درجه باز یا بخش G برای عبور DNA دو رشته‌ای دیگر ایجاد می‌کند. آنزیم‌های نوع II در پروکاریوت دارای دو زیر واحد متفاوت هستند که یک ساختار هتروترامریک را عرضه می‌کنند، در حالی که توپوایزومرازهای یوکاریوتیک همودایمر هستند. در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی توپوایزومرازهای نوع II جهت تکثیر DNA، خارج کردن سوپر کویل‌های مرتبط با رونویسی و تفکیک کروموزومی در طول میتوز لازم و ضروری هستند. کشف توپوایزومرازهای نوع II در ارکی‌ها باعث شد این آنزیم‌ها به دو نوع IIA و IIB

طبقه‌بندی شوند. آنزیم‌های نوع IIA شامل DNA ژیرازهای یوباکترها (که مطابق با توپوایزومراز II یوکاریوتی است)، توپوایزومراز تایپ IV یوباکترها و توپوایزومراز II یوکاریوتیک پستانداران و قارچ‌ها (در پستانداران دو نوع توپوایزومراز IIA وجود دارد: توپوایزومراز IIA₁ و IIA₂) می‌شوند. نوع IIB شامل توپوایزومراز تایپ VI ارکی‌ها از سولفولوبوس شیباتی (*Sulfolobus shibatae*) می‌شود (17، 18).

جدول شماره 1: انواع DNA توپوایزومرازها (19)

زیرمجموعه	انواع DNA توپوایزومرازهای یوکاریوتی و پروکاریوتی
IA	DNA توپوایزومراز I و II باکتریال، DNA توپوایزومراز III قارچی، DNA توپوایزومراز III ₁ و III ₂ پستانداران
IB	DNA توپوایزومراز I موتومیک یوکاریوتی، DNA توپوایزومراز I میتوکندریال پستانداران، DNA توپوایزومراز I زیر واحد دو کیتوبلاستیندا، توپوایزومراز I پاکس ویروس
IIA	ژیراز باکتریال، DNA توپوایزومراز IV، DNA توپوایزومراز IIA ₁ و IIA ₂ قارچی، DNA توپوایزومراز II دروزفلا، DNA توپوایزومراز IIA ₁ و IIA ₂ پستانداران
IIB	DNA توپوایزومراز VI سولفولوبوس شیباتی

DNA توپوایزومراز: هدف دارویی مناسب در درمان لیشمانیوز؟

اگرچه ژن‌ها و پروتئین‌های توپوایزومرازهای لیشمانیایی در بسیاری از خصوصیات با همولوگ انسانی مشابه‌اند، اما تفاوت‌های خاصی مانند اختلاف در فعالیت آنزیمی و حساسیت به توکسین‌های توپوایزومراز، درمان ضدانگلی بر پایه‌ی این تارگت دارویی را توجه می‌کند. ژن‌های توپوایزومراز در تریپانوزوماتیدهای گوناگونی گزارش شده‌اند از جمله: بلاستوکریتیدیا کولیسس (20)، کریتیدیا فاسیوکولانا (21)، لیشمانیا اینفانتوم (22) تریپانوزوما بروسی (23)، لیشمانیا شاگاسی (24) و لیشمانیا دنووانی (25، 26). ساختن عاملی که جلوی فعالیت DNA توپوایزومرازها را بگیرد، از حفظ شکل توپولوژیک جلوگیری می‌کند و همانندسازی روند نرمال خود را طی نمی‌کند و ارگانسیم از بین می‌رود. جهت استفاده از بازدارنده‌ها، مطالعات بسیاری در مورد تفاوت بین توپوایزومرازهای نوع II هسته‌ای و میتوکندریایی انجام شده است و برای درمان ضد انگلی، مهار انتخابی توپوایزومراز میتوکندریایی در نظر گرفته می‌شود (27).

تنپوساید (Teniposide) به عنوان عوامل ضد تومور، توپوایزومراز II یوکاریوتی را متوقف می کنند (29-32). لیست مهارکننده های DNA توپوایزومراز در جدول شماره 2 نشان داده شده است.

جدول شماره 2: انواع مهارکننده های DNA توپوایزومراز (56,57)

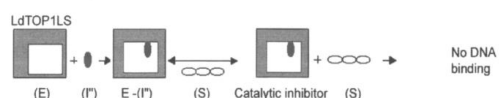
جفت	مکانیسم اثر	داروها/ بازدارنده ها	گروه دارویی
توپو II	سم توپوایزومراز	m-AMSA 9-اینلیوآکریدین	اکریدین ها
توپو II متصل به DNA	الحاق در DNA	اکریفلاین	اکریدین ها
توپو II متصل به DNA	الحاق در DNA	پنتریدین	ایدیوم پروماید
توپو II متصل به DNA	اتصال با شکاف کوچک DNA	برنیل دیسنامپسین	دیسیان اسورات
توپو IB	مهارکننده توپوایزومراز	سایم استیوگلوکوات استیامین اوره	آنتی موان 5 ظرفیتی
توپو I و II	سم توپوایزومراز دوگانه	کورستین لوتتین	فلاونوئیدها
توپو I و II	سم توپوایزومراز دوگانه	بتولینیک اسید دی هیدرو بتولینیک اسید	تیرتینوئیدها
توپو I	سم توپوایزومراز	کاپتوتسین توپونکان ایرنونکان 9-امینو-کاپتوتسین	الکلوئیدها
توپو I	سم توپوایزومراز	اماروزتین	گیگوزیدها
توپو I	سم توپوایزومراز	دیوسیرین	یس نفوکیون
توپو II	سم توپوایزومراز	اتوپوساید تیتوساید	پودوفیلوتوکسین
ژیراز باکتریال، توپو IV و توپو II	سم توپوایزومراز	نالدیکسیک اسید اکسولینیک اسید	کینولون ها
توپو II	سم توپوایزومراز	نورفلوکساسین سیروفلوکساسین فلوکساسین	فلوروکینولون ها
توپو I و II	سم توپوایزومراز دوگانه	2-2-دی-کرو استامیدوزیل) 3- (3- ایندولیل) - کینولون مشتقات Br	ایندولیکینولون ها
توپو I و II	سم توپوایزومراز دوگانه	سایتوتین اینتولین	آنتی یوتیک ها
ژیراز و توپو II	مهارکننده توپوایزومراز	نویوسین کلروئوسین	کومارین ها
توپو I	مهارکننده توپوایزومراز	تا لاپاکون و مشتقات	اورتوفتوکیون
Topo II	مهارکننده توپوایزومراز	ارکتینین تراکوزین	لیگنولیدها

معمولاً داروهای DNA توپوایزومراز، دو واکنش کاملاً متمایز را نشان می دهند: این داروها می توانند با ATP برای اتصال به توپوایزومراز رقابت کنند و در فعالیت کاتالیتیک آنزیم مداخله کنند (کلاس II) یا فرم حد واسط توپوایزومراز -DNA که منجر به شکستن DNA می شود را محصور و تثبیت کنند (کلاس I) (تصویر شماره 2) (28).

Class I topoisomerase inhibitor



Class II topoisomerase inhibitor



تصویر شماره 2: نمایش شماتیک مکانیسم مهار DNA توپوایزومراز I و II در لیشمانیا دنووانی (28)

در مورد اول، داروها به عنوان مهارکننده های توپوایزومراز معرفی می شوند و مهارکننده ی توپوایزومرازهای II یوکاریوتیک و ژیراز باکتریال هستند مانند کومرماسین A (coumermycin A)، نوویوسین (Novobiocin) و کلروبیوسین (Chlorobiocin) که در مجموع کومارین ها (Coumarins) نامیده می شوند. در مورد دوم، داروهایی که مجموعه ی کووالانت DNA- آنزیم را تثبیت می کنند، توکسین (سم) توپوایزومراز نامیده می شوند. چنین داروهایی مسیرهایی مانند وقفه چرخه سلولی و آپوپتوزیس را فعال می کنند و مهارکننده های توپوایزومراز I و II یوکاریوتیک، ژیراز و عوامل ضد توموری را شامل می شوند. کینولون های (Quinolones) مثل نالدیکسیک اسید (Nalidixic acid)، اکسولینیک اسید (Oxolinic acid) و ترکیبات مرتبط، ژیراز باکتریال را مهار می کنند. کامپتوتسین (Camptothecin) روی توپوایزومراز I یوکاریوتی عمل می کند، در حالی که امساکرین (Amsacrine)، اتوپوساید (Etoposide) و

توکسین های توپوایزومراز

به دلیل تاثیر توپوایزومراز نوع I بر روی فعالیت لیشمانیا دنووایی و سایر تریپانوزوماتیده، به نظر می رسد برای درمان ضد لیشمانیایی مناسب باشد (33). مهارکننده های توپوایزومراز I در تریپانوزوماتیدهایی مانند لیشمانیا، کمپلکس های پایداری با DNA میتوکندریال و هسته ای ایجاد می کنند که منجر به اختلال همانندسازی DNA و مرگ سلولی می شود (34). سدیم استیوگلوکونات (Sodium stibogluconate) با نام تجاری پنتوستام و استیامین اوره (urea stibamine) دو داروی ضد لیشمانی هستند که با مهار DNA توپوایزومراز I و تثبیت کمپلکس دوتایی به عنوان سم های توپوایزومراز تلقی می شوند (35). کامپوتوسین به عنوان بازدارنده DNA توپوایزومراز یوکاریوتی شناخته شده است که برای سلول های توموری سمی می باشد (36).

کامپوتوسین برای لیشمانیا سایتو توکسیک است و باعث تخریب DNA هسته ای می شود. البته این دارو حلقه های کوچک DNA را نیز با آنزیم محصور می کند و تأثیر دارو در تکثیر سلولی مشاهده می شود، چون کامپوتوسین تلفیق $[H^3]$ تیمیدین را در لیشمانیا دنووایی مهار می کند (37). لاکتون کامپوتوسین (Camptothecinlactone) و آنالوگ های آن نسبت به کامپوتوسین در کشتن تریپانوزوم ها در شرایط آزمایشگاهی 40 برابر تاثیر گذارتر هستند. چنین مشتقاتی با مهار انتخابی فعالیت توپوایزومراز I عملکرد ضد انگلی خود را نشان می دهند (36). در سال 2016، مامیدالا و همکارانش با روش intuitive scaffold hopping و با تغییرات زیست سنجی مهارکننده های شتاخته شده ی Top1 مانند کامپوتوسین، اندوتکارین (Andotecarin)، دیفلوموتکان (Diflomotecan) و روسستاکین (Rosettacin)، یک سری مشتقات فوروپایریدین دیون (furopyridine dione) را به عنوان مهارکننده های LdTop1 (توپوایزومراز I لیشمانیا دنووایی) گزارش کردند (38). مطالعات نشان داده است دیگر

مشتقات کامپوتوسین مانند توپوتکان (Topotecan)، ایرینوتکان (Irinotecan) و 9-امینو کامپوتوسین (9-amino-camptothecin) نیز فعالیت کاتالایتیک توپوایزومراز I را در سلول های توموری مهار می کنند (31،39). بنابراین باید مطالعات بیش تری در زمینه پتانسیل درمانی این داروها در درمان عفونت های تریپانوزوماتیدی مانند عفونت های لیشمانیایی انجام شود. آماروژنتین (Amarogentin) جز فعال عصاره گیاهی مریم کوهی (Swertia chirata) می باشد و با جلوگیری از تشکیل کمپلکس DNA-آنزیم، توپوایزومراز نوع I را در تریپانوزوماتیدها مهار می کند. در لیشمانیا دنووایی، این دارو relaxation DNA را مهار می کند؛ آماروژنتین در مقایسه با کامپوتوسین نتایج مهارکنندگی مشابهی دارد (40). دیوسپیرین (Diospyrin) با جلوگیری از فعالیت کاتالایتیک DNA توپوایزومراز نوع I، شبیه به کامپوتوسین می باشد و یک سم توپوایزومراز است. این دارو بر روی توپوایزومراز II تأثیر ندارد. همچنین یک ترکیب گیاهی است که از رشد پروماستیگوت های لیشمانیا دنووایی جلوگیری می کند (34،41). البته تأثیرات بیوشیمیایی و ساختاری دیوسپیرین بر روی شبکه kDNA هنوز هم نیاز به مطالعات گسترده تری دارد.

در مطالعاتی گزارش شده است یکی دیگر از ترکیبات ضد توموری، 9-انیلینو اکریدین (9-anilino acridines) و مشتقات آن که به صورت سم توپوایزومرازی عمل می کنند، دارای فعالیت قوی ضد لیشمانیایی می باشند (42). 9-انیلینو اکریدین به عنوان مهارکننده ی توپوایزومراز II، از رشد آماستیگوت و پروماستیگوت لیشمانیا ماژور جلوگیری می کند (43). این ترکیبات، کمپلکس های قابل شکاف در هسته و کینتوپلاست لیشمانیا شاگاسی را نیز تثبیت می کنند. این ترکیبات در مقابل آنزیم های انسانی اثر سایتوتوکسیسته نشان می دهند و عوامل انتخابی نیستند (44). امساکرین (m-AMSA, acridinyl anisidide) نیز با افزایش سطح توپوایزومراز II وابسته به DNA نقش خود را ایفا

می‌کند و این آنزیم را به یک توکسین سلولی قوی تبدیل می‌کند. در سلول‌های پستانداران، آنزیم‌های میتوکندریایی و هسته‌ای، بعد از مواجهه با امساکرین تحت تأثیر قرار می‌گیرند. اتوپوساید (VP16-213) یک بازدارنده دیگر یوکاریوتی برای توپوایزومراز II است که باعث تشکیل کمپلکس پایدار بین توپوایزومراز II و حلقه‌های کوچک یا حلقه‌های بزرگ کینتوپلاست می‌شود و فعالیت آنزیمی را مختل می‌کند؛ بنابراین تریپانوزوماتیدهای درمان شده با اتوپوساید شبکه kDNA ایی را عرضه می‌کنند که عملکرد خود را از دست داده است. البته اتوپوساید هیچ تأثیری روی رشد سلولی یا ساختمان فضایی کینتوپلاست پروماستیگوت‌های لیشمانیا آمازوننسیس نداشته است، حتی زمانی که تک‌یاخته با دوز بالای (500 µg/ml) این دارو کشت داده می‌شود.

در مطالعه سایر محققین نیز نشان داده شد که اتوپوساید در کاهش پروماستیگوت‌های متحرک لیشمانیا دنووانی کاهش چندانی نداشته است (45-47). با توجه به بررسی‌های متعدد گزارش شده است بتولینیک اسید (Betulinic acid) یک مهارکننده قوی توپوایزومراز تأثیرات I و II می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده است دی‌هیدروبتولینیک اسید (DHBA) یکی از مشتقات بتولینیک اسید، علاوه بر خاصیت ضد HIV، بازدارنده‌ی دیگر توپوایزومراز I و II لیشمانیا نیز می‌باشد، به طوری که در بررسی با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) با مواجهه پروماستیگوت‌های لیشمانیا با 5 میکرومول DHBA به مدت 8 ساعت، توده‌های کروماتینی فنجانی شکل در حاشیه هسته‌ی سلول مشاهده شد که ویژگی بارز آپتوز و مرگ سلولی می‌باشد. این مطالعات نشان داده است DHBA یک ترکیب ضد لیشمانیایی قوی است که با هدف قرار دادن توپوایزومرازهای انگلی، آپتوز را القا می‌کند (48-50). کینولون‌ها زیر واحد ADNA ژیراز باکتریال و توپوایزومراز IV که در واکنش‌های شکافت و اتصال مجدد DNA دخیل هستند مورد هدف قرار می‌دهد.

کینولون‌ها از جمله نالیدیکسیک اسید، اثر خود را روی توپوایزومراز نوع II تریپانوزوماتیدی از طریق مهار رشد سلولی و تغییرات ساختمان kDNA اعمال می‌کنند. این مهارکننده روی رشد وقفه سلولی لیشمانیا آمازوننسیس و سایر تریپانوزوماتیدها نسبت به اتوپوساید (مهارکننده توپوایزومراز II یوکاریوتی) مؤثرتر می‌باشد.

با توجه به مطالعات انجام شده، داروهایی که توپوایزومراز باکتریال را مورد هدف قرار می‌دهند، برای درمان ضد تریپانوزوماتیدی اهمیت بیش‌تری دارند. فعالیت انتخابی فلوروکینولون‌های (Fluoroquinolones) مانند انوکساسین (enoxacin)، سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) و افلوکساسین (Ofloxacin) در مقابل اماسیتیگوت لیشمانیا پاتا مننسیس در شرایط برون‌تنی نشان داد که این ترکیبات توپوایزومراز II را در غلظت‌های قابل دسترس مهار می‌کند (51). همچنین فلوروکینولون‌ها در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی بر روی لیشمانیا دنووانی اثر دارند. آنالوگ‌های دو حلقه‌ای آن آنزیم‌های میتوکندریال را مورد هدف قرار می‌دهند و ترکیبات چهار حلقه‌ای آن بیش از 50 فولد سمی‌تر از افلوکساسین است (چون یک حلقه تiazol بیش‌تر دارد) (52). البته ایندولیل کینولون‌های سنتتیک مانند 2-(۳-۴-دی کلرو استامیدوبنزیل) -3- (۳-ایندولیل) -کینولون (2-(2-dichloro-acetamidobenzo)- 3-(3'-indolyl)-quinolone) و مشتقات (Br) نیز از فعالیت تریپانوسیدال قوی برخوردار هستند. این ترکیبات با مهار توپوایزومرازهای I و II روی همانندسازی kDNA لیشمانیا دنووانی تأثیر می‌گذارند، سم‌های توپوایزومرازی دوگانه نامیده می‌شوند. در حقیقت توپوایزومرازهای تریپانوزوماتیدی از سایر آنزیم‌های یوکاریوتی به اندولیل کینولون‌ها مستعدتر هستند و به یافتن افق‌های جدید در درمان دارویی کمک می‌کنند. ساینترین و اینتوپلیسین آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که هر دو نوع توپوایزومراز را مهار می‌کنند و فعالیت آن‌ها را با تثبیت کمپلکس آنزیم - DNA کاهش می‌دهند (53-55).

مهارکننده توپوایزومرازها

نووایوسین و آنالوگ‌های ساختاری آن مانند کلروایوسین و کومرمایسین، زیرواحد B توپوایزومرازهای II باکتریال یا ژیرازها را مورد هدف قرار می‌دهند. این دسته از داروها، مهارکننده‌های رقابتی فعالیت ATPase کاتالیز شده به وسیله GyTB هستند و با ATP برای اتصال به آنزیم رقابت می‌کنند (58، 59).

نووایوسین در کینتوپلاست تریپانوزوماتیدها تغییرات فراساختاری ایجاد می‌کند، البته بعضی گونه‌ها ساختمان kDNA را حفظ می‌کنند. این دارو تکثیر سلولی اماسیگوت لیشمانیا را متوقف می‌کند و انگل‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی ایجاد می‌کند. اگر انگل در محیط حاوی کلروایوسین کشت داده شود، این تأثیر 5 برابر قوی‌تر می‌شود. مطالعات نشان داده است که پروماستیگوت‌های لیشمانیا آمازوننسیس کشت داده شده در محیط حاوی نووایوسین به مدت 48 ساعت، دچار اختلال در رشد و لیز سلولی می‌شوند (60). بتا لاپاکون (β -lapachone) یک اورتونفتوکینون می‌باشد و منشأ آن درختی است که سال‌ها عصاره آن برای مصارف پزشکی استفاده شده است. این دارو بدون تشکیل کمپلکس آنزیم-DNA فعالیت کاتالایزیک توپوایزومراز I را مهار می‌کند. همچنین β -لاپاکون باعث مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی انسان می‌شود. در مطالعات متعددی نشان داده شده است که آپیتوز القا شده توسط لاپاکون β مستقل از P53 و کاسپاز و وابسته به NAD(P)H-کینون اکسیدوردکتاز 1 (NQA1) عمل خواهد کرد (61). قابل ذکر است که اخیراً ترکیبات دیگری از اورتونفتوکینون‌ها با مهار توپوایزومراز II و بدون اثرات توکسیک خاصی بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا آمازوننسیس و لیشمانیا برازیلینسیس عملکرد خوبی نشان داده‌اند (62).

داروهای متصل شونده به DNA داروهای الحاقی و غیرالحاقی آکریفلاوین (Acriflavine) یک داروی الحاقی می‌باشد که بازدارنده انتخابی سنتز DNA کیتوپلاستی

است، در حالی که در تکثیر DNA هسته‌ای بی‌تأثیر می‌باشد. ارتباط این داروها با فعالیت ضد لیشمانیایی در مقایسه با سایر تارگت‌های کینتوپلاستی مانند توپوایزومرازها به خوبی روشن نیست. از آنجائی که تأثیر مواد الحاقی می‌تواند منجر به کمبود kDNA فیبریل مرکزی شود، این پدیده در ابتدا به نام آکینوپلاستی شناخته شد. بعدها واژه آکینوپلاستی به دیس کینتوپلاستی تغییر یافت. چون پس از درمان با اکریفلاوین بازآرایی یا فقدان kDNA رخ می‌دهد و کینتوپلاست به‌عنوان یک ساختار محصور شده با غشا در سلول باقی می‌ماند. سلول‌های دیس کینتوپلاستی در نتیجه مهار انتخابی سنتز kDNA و توزیع بی‌قاعده آن‌ها در طول تقسیم سلولی حاصل می‌شوند. مطالعات بعدی با آکریفلاوین نشان داد که استرین دیس کینتوپلاستیک القا شده با رنگ، یک ابزار قوی جهت مطالعه نقش‌های بیولوژیک مرتبط با kDNA ایجاد می‌کند. گزارش شده است که آکریفلاوین با تنفس میتوکندریایی، رشد سلولی، تکثیر kDNA و تقسیم آن بین سلول‌های دختر مداخله می‌کند. علاوه بر این، اکریفلاوین تغییرات فراساختاری روی تریپانوزوماتیدها اعمال می‌کند، به‌طوری که در لیشمانیا تارتتولا، کرتید یا فاسیکولاتا و تریپانوزوما بروسئی میتوکندری‌های متورم با کریستاهای وسیع و یک kDNA متراکم مشاهده می‌شود که بعد از مواجهه با دارو ناپدید می‌شوند (63، 64). سلول‌های دیسکینتوپلاستیک بعد از مواجهه با داروهای غیر الحاقی مانند برنیل (Berenil)، پنتامیدین (pentamidine) و آنتری ساید (Antrycide) نیز حاصل می‌شوند (65). برخلاف داروهای الحاقی این دسته از ترکیبات در جایی که سکانس‌های DNA غنی از آدنین و تیمین باشد، با شکاف کوچک DNA پیوند می‌خورند (66). ژنوم لیشمانیا و تریپانوزوما دارای ژن کدکننده TopIA پروکاریوتی و TopIB یوکاریوتی می‌باشد (67). DNA توپوایزومرازهای نوع II قادر به واکنش با DNA که شکاف کوچک آن با برنیل اشغال شده است، نمی‌باشند و داروی دریافتی نیز سبب کاهش سطح آنزیم

در همانندسازی DNA، رونویسی و بسیاری از فرایندهای حیاتی سلول تارگت‌های دارویی بسیار مناسبی هستند. مطالعات متعدد نشان داده است مهارکننده‌های توپوایزومرازها، این آنزیم‌ها را به توکسین‌های داخل سلولی و یک ابزار مناسب برای کشتن انگ در میزبان تبدیل می‌کنند.

داروهای متعددی همچون داروهایی که در درمان تومورها مؤثرند، به‌عنوان عوامل درمانی بالقوه مورد توجه واقع شده‌اند. تاکنون اکثر ترکیباتی که بر روی انگل لیشمانیا آزمایش شده‌اند و کینتوپلاست را تحت تأثیر قرار می‌دهند، بازدارنده‌های انتخابی توپوایزومراز نوع II هستند. مهارکننده‌های توپوایزومراز I و داروهای متصل شونده به DNA نیز باید به‌طور گسترده‌تری به‌عنوان ترکیبات درمانی ضد عفونت لیشمانیایی کاربرد داشته باشند (73). با توجه به مطالعات مختلف، استنباط می‌شود کلاس‌های اصلی مهارکننده‌های توپوایزومراز تأثیرات فیزیولوژیک متفاوتی ایجاد می‌کنند که می‌تواند به فاکتورهایی مانند نفوذپذیری به غشاهای سلولی، مقاومت ناشی از تغییرات جایگاه‌های اتصالی آنزیم به دارو و خصوصیات فارماکو کینتیک مرتبط باشند. کشف داروهای جدید از منابع طبیعی و سنتتیک که نسبت به انگل‌ها نفوذپذیرترند و سمیت کمتری در سلول‌های پستانداران دارند، دارای اهمیت ویژه‌ای بوده و مستلزم بررسی‌های بیش‌تری می‌باشند.

References

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012; 7(5): e35671.
 - Faridnia R, Kalani H, Fakhar M, Akhtari J. Investigating in vitro anti-leishmanial effects of silibinin and silymarin on *Leishmania major*. Annals of Parasitology 2018; 64(1): 29-35.
 - Akhtari J, Faridnia R, Kalani H, Bastani R, Fakhar M, Rezvan H, Beydokhti AK. Potent in vitro antileishmanial activity of a nanoformulation of cisplatin with carbon nanotubes against *Leishmania major*. J Glob Antimicrob Resist 2018; 16(2019): 11-16.
 - Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution,
- می‌شود. علاوه بر آن، برنیل مانع از تفکیک kDNA شده و ممکن است با مهار آزادسازی حلقه‌های کوچک همانندسازی را مختل کند (68). همچنین در سال 2012 مطالعه‌ی دیگری در هند نشان داده است مولکول secohydroxy-aza-CBI-TMI یک تارگت دارویی متصل شونده به DNA جهت درمان لیشمانیوز است (69). داروهای متصل شونده به DNA (الحاقی و غیرالحاقی)، به‌عنوان بازدارنده‌های فعالیت توپوایزومراز میتوکندریایی سلول‌های پستانداران شرح داده شده است؛ اما احتمال آن‌که DNA هسته‌ای را تحت تأثیر قرار بدهند کم است، به این دلیل که کمپلکس‌های قابل شکاف با DNA توپوایزومرازهای نوع II هسته‌ای مشاهده نشده است (70-72). اطلاعات ذکر شده مؤید این مطلب است که چنین داروهایی ترجیحاً با DNA میتوکندریال مداخله می‌کنند. درمان دارویی لیشمانیازیس تا به امروز رضایت‌بخش نبوده و معمولاً دوزهای دارویی مورد نیاز جهت حذف انگل از بدن منجر به توکسیسته در میزبان می‌شود. چالش در درمان دارویی لیشمانیازیس به منظور یافتن تارگت‌های مولکولی ویژه‌ای است که توکسیسته در میزبان را به حداقل برسانند. بنابراین تحقیقات برای یافتن موردی مناسب برای این امر، شامل تعیین تارگت دارویی کامل و فهم مکانیسم اثر دارو همچنان ادامه دارد. به‌طور کلی توپوایزومرازها نوع I یا II، در یوکاریوت‌ها یا در پروکاریوت‌ها به علت داشتن نقش‌های مهم بیولوژیکی

- and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis 2016; 10(3): e0004349.
5. Keighobadi M, Akhtari J, Fakhar M, Emami S, Mirzaei H. An overview on anticancer drugs with antileishmanial activity. J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28(161): 154-165 (Persian).
 6. Keighobadi M, Fakhar M, Emami S. Hypothesis: the potential application of doxorubicin against cutaneous leishmaniasis. Trop Parasitol 2015; 5(1): 69-70.
 7. Chawla B, Madhubala R. Drug targets in *Leishmania*. J Parasit Dis 2010; 34(1):1-13.
 8. Fakhar M, Mohebbi M, Ahmadpour E. Visceral Leishmaniasis. Gorgan: Noruzi publisher; 1393. (Persian).
 9. Shokri A, Akhtari J, Keighobadi M, Fakhar 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.
 10. Esteves AM, Simpson L. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria – a review. Gene 1999; 240(2): 247-260.
 11. Morris JC, Drew ME, Klingbeil MM, Motyka SA, Saxowsky TT, Wang Z, et al. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. Int J Parasitol 2001; 31(5-6): 453-458.
 12. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. Curr Mol Med 2004; 4(6): 623-647.
 13. Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EEC, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. Trends Parasitol 2005; 21(8): 363-369.
 14. Liu Y, Englund PT. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. Mol Microbiol 2007; 64(3): 676-690.
 15. Klingbeil MM, Englund PT. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. Proc Nat Acad Sci USA 2004; 101(13):4333-4334.
 16. Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. ACS Chem Biol 2013; 8(1): 82-95.
 17. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. Annu Rev Biochem 2001; 70: 369-413.
 18. Buhler C, Gadelle D, Forterre P, Wang JC, Bergerat A. Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res 1998; 26(22): 5157-5162.
 19. Das BB, Sen N, Dasgupta SB, Ganguly A, Das R, Majumder HK. Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. Indian J Med Res 2006; 123(3): 221-232.
 20. Lourenço EE, Cavalcanti DP, Picchi GFA, De Souza W, Krieger MA, Motta MCM, et al. Molecular characterization of type II topoisomerase in the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. FEMS Microbiol Lett 2006; 257(1): 163-170.
 21. Pasion SG, Hines JC, Aebersold R, Ray DS. Molecular cloning and expression of the gene encoding the kinetoplast-associated type II DNA topoisomerase of *Crithidia fasciculata*. Mol Biochem Parasitol 1992; 50(1): 57-68.
 22. Hanke T, Ramiro MJ, Trigueros S, Roca J, Larraga V. Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*: a new potential target for anti-

- parasite drugs. Nucleic Acids Res 2003; 31(16): 4917-4928.
23. Bodley AL, Chakraborty AK, Xie S, Burri C, Shapiro TA. An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(13): 7539-7544.
24. De Sousa JM, Lareau SM, Pearson RD, Carvalho EM, Mann BJ, Jeronimo SM. Characterization of *Leishmania chagasi* DNA topoisomerase II: a potential chemotherapeutic target. Scand J Infect Dis 2003; 35(11-12): 826-829.
25. Chakraborty AK, Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. Biochem Biophys Res Commun 1988; 152(2): 605-611.
26. Chakraborty AK, Majumder HK. Decatenation of kinetoplast DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol 1987; 26(3): 215-224.
27. Fragoso SP, Goldenberg S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. Mol Biochem Parasitol 1992; 55(1-2): 127-134.
28. Majumder HK. Drug targets in kinetoplastid parasite. Preface. Adv Exp Med Biol 2008; 625: 103-113.
29. Gellert M, O'Dea MH, Itoh T, Tomizawa J. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73(12): 4474-4478.
30. Kaufmann SH. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. Biochem Biophys Acta 1998; 1400(1-3): 195-211.
31. Bodley AL, Wani MC, Wall ME, Shapiro TA. Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs. Structure-activity correlations. Biochem Pharmacol 1995; 50(7): 937-942.
32. Bodley AL, Shapiro TA. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(9): 3726-3730.
33. Chakraborty AK, Gupta A, Majumder HK. A type I DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. Indian J Biochem Biophys 1993; 30(5): 257-263.
34. Ray S, Hazra B, Mitra B, Das A, Majumder HK. Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. Mol Pharmacol 1998; 54(6): 994-999.
35. Chakraborty AK, Majumder HK. An ATP independent catenating enzyme from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. Biochem Biophys Res Commun 1991; 180(1): 279-285.
36. Bodley AL, Wani MC, Wall ME, Shapiro TA. Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs. Structure-activity correlations. Biochem Pharmacol 1995; 50(7): 937-942.
37. Bodley AL, Shapiro TA. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(5): 3726-3730.
38. Mamidala R, Majumder P, Jha K, Bathula C, Aqarwal R, Chary MT et al. Identification of *Leishmania donovani* Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. Sci Rep 2016; 6: 26603.
39. Yanaihara T, Yokoba M, Yamamoto M, Ryuge S, Hagiri S, Katagiri M, et al. Phase I and pharmacologic study of irinotecan and amrubicin in advanced non-small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2007; 59(4): 419-427.

40. Ray S, Majumder HK, Chakravarty AK, Mukhopadhyay S, Gil RR, Cordell GA. Amarogentin, a naturally occurring secoiridoid glycoside and a newly recognized inhibitor of topoisomerase I from *Leishmania donovani*. J Nat Prod 1996; 59(1): 27-29.
41. Yardley V, Snowden D, Croft SL, Hazra B. In vitro activity of diospyrin and its derivatives against *Leishmania donovani*, *Trypanosomacruzi* and *Trypanosoma brucei*. Phytother Res 1996; 10(7): 559-562.
42. Figgitt D, Denny W, Chavalitsheewinkoon P, Wilairat P, Ralph R. In vitro study of anticancer acridines as potential antitrypanosomal and antimalarial agents. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(8): 1644-1647.
43. Gamage SA, Figgitt DP, Wojcik SJ, Ralph RK, Ransijn A, Mauel J, et al. Structure-activity relationships for the antileishmanial and antitrypanosomal activities of 1'-substituted 9-anilinoacridines. J Med Chem 1997; 40(16): 2634-2642.
44. Werbovetz KA, Spoors PG, Pearson RD, Macdonald TL. Cleavable complex formation in *Leishmania chagasi* treated with anilinoacridines. Mol Biochem Parasitol 1994; 65(1): 1-10.
45. Shapiro TA, Klein VA, Englund PT. Drug-promoted cleavage of kinetoplast DNA minicircles. J Biol Chem 1989; 264(7): 4173-4178.
46. Shapiro TA, Englund PT. Selective cleavage of Kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(3): 950-954.
47. Werbonetz KA, Lehnert EK, Macdonald TL, Pearson RD. Cytotoxicity of Acridine Compounds for *Leishmania* Promastigotes In Vitro. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(2): 495-497.
48. Chowdhury AR, Mandal S, Mittra B, Sharma S, Mukhopadhyay S, Majumder HK. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. Med Sci Monit 2002; 8(7): 254-265.
49. Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentino LM, Chen CH, Garrett PE, Lee KH. Betulinic acid and Dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. J Med Chem 1996; 39(5): 1016-1017.
50. Chowdhury AR, Mandal S, Goswami A, Ghosh M, Mandal L, Chakraborty D, et al. Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by primarily targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanial therapy. Mol Med 2003; 9(1-2): 26-36.
51. Romero IC, Saravia NG, Walker J. Selective Action of Fluoroquinolones against Intracellular Amastigotes of *Leishmania* (*Viannia*) panamensis In vitro. J Parasitol 2005; 91(6): 1474-1479.
52. Croft SL, Hogg J. Limited activity of bacterial DNA topoisomerase II inhibitors against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* amastigotes in vitro. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82(6): 856.
53. Ray S, Sandhukhan PK, Mandal NB, Mahato SB, Majumder HK. Dual inhibition of DNA topoisomerases of *Leishmania donovani* by novel indolyl quinolones. Biochem Biophys Res Commun 1997; 230(1): 171-175.
54. Poddevin B, Riou JF, Lavelle F, Pommier Y. Dual topoisomerase I and II inhibition by intoplicine (RP-60475), a new antitumor agent in early clinical trials. Mol Pharmacol 1993; 44(4): 767-774.
55. Leteurtre F, Fujimori A, Tanizawa A, Chabra A, Mazumder A, Kohlhagen G, et al. Saintopin,

- a dual inhibitor of DNA topoisomerases I and II, as a probe for drug-enzyme interactions. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 28702-28707.
56. Das A, Dasgupta A, Sengupta T, Majumder HK. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends Parasitol* 2004; 20(8): 382-387.
57. Keighobadi M, Emami S, Tarsi AK, Fakhar M. Down-regulation of peroxin synthesis by silencing RNA (siRNA): A novel hypothesis for treatment of leishmaniasis. *Indian J Dermatol, Venereol Leprol* 2016; 82(4): 436-437.
58. Lewis RJ, Tsai FT, Wigley DB. Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. *Bioessays* 1996; 18(8): 661-671.
59. Maxwell A. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol* 1997; 5(3): 102-109.
60. Cavalcanti DP, Fragoso SP, Goldenberg S, De Souza W, Motta MCM. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. *Parasitol Res* 2004; 94(6): 439-448.
61. Pardee AB, Li YZ, Li CJ. Cancer therapy with beta-lapachone. *Curr Cancer Drug Targets* 2002; 2(3): 227-242.
62. de Araújo M, de Souza PS, de Queiroz AC, da Matta CB, Leite AB, da Silva AE et al. Synthesis, Leishmanicidal Activity and Theoretical Evaluations of a Series of Substituted bis-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones. *Molecules* 2014; 19(9): 15180-15195.
63. Trager W, Rudzinska MA. The riboflavin requirement and the effects of acriflavin on the fine structure of the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. *J Protozool* 1964; 11: 133-145.
64. Schnauffer A, Domingo GJ, Stuart K. Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids. *Int J Parasitol* 2002; 32(9): 1071-1084.
65. Hajduk SL. Influence of DNA complexing compounds on the Kinetoplast of trypanosomatids. *Prog Mol Subcell Biol* 1978; 6: 158-200.
66. Dervan PB. Design of sequence-specific DNA-binding molecules. *Science* 1986; 232(4749): 464-471.
67. Chowdhury SR, Majumder HK. DNA Topoisomerases in unicellular pathogens: Structure, function, and druggability. *Trends Biochem Sci* 2019; 44(5):415-432.
68. Portugal P. Berenil acts as a poison of eukaryotic topoisomerase II. *FEBS Lett* 1994; 344(2-3): 136-138.
69. Chauhan N, Vidyarthi AS, Poddar R. Comparative Analysis of Different DNA-Binding Drugs for Leishmaniasis Cure: A Pharmacoinformatics Approach. *Chem Biol Drug* 2012; 80(1): 54-63.
70. Fairfield FR, Bauer WR, Simpson MV. Mitochondria contain a distinct DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 1979; 254(19): 9352-9354.
71. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984; 226(4673): 466-468.
72. Reguera RM, Elmahallawy EK, García-Estrada C, Carbajo-Andrés R, Balaña-Fouce R. DNA topoisomerases of *Leishmania* parasites; druggable targets for drug discovery. *Current Med Chem* 2019; 26(32): 5900-5923.
73. Zuma AA, Cavalcanti DP, Maia MC, De Souza W, Motta MC. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37(5): 449-456.