

A study on the cytotoxic effect of cantharidin on *Leishmania major* promastigote and amastigote survival in vitro

Maroufi Y¹, Ghaffarifar F^{1*}, Dalimi A¹, Sharifi Z², Hasan Z³

1- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Virology, Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

Received June 26, 2011; Accepted November 13, 2011

Abstract:

Background: Leishmaniasis is one of the major public health problems in many countries. Cantharidin, a type of terpenoid and a potent vesicant found in the *Meloidae* and *Oedemeridae* beetle families, has been used to treat wart in traditional medicine. This study was carried out to examine the cytotoxic effect of cantharidin on the survival of promastigote and macrophage infected with *Leishmania major* in vitro.

Materials and Methods: This experimental study was performed on promastigote and infected macrophages (10^6 and 10^5 parasites/mL, respectively). The effect of cantharidin (0.5-50 $\mu\text{g/mL}$) on *Leishmania major* promastigote and amastigote survival in vitro was determined using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 24, 48 and 72h.

Results: Results showed that the cytotoxicity rate of cantharidin with concentrations of 50 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ in the promastigote, infected and non-infected macrophages after 72h were 49.86% and 14.26%; 29.97% and 2.33%; 22.86% and 15.23%, respectively.

Conclusion: Cantharidin has a cytotoxic effect on the promastigote and macrophages infected with *Leishmania major*. However, further studies are recommended to investigate the efficacy of this compound in vivo.

Keywords: Cantharidin, *Leishmania major*, Promastigote, Amastigote, Cytotoxic

* Corresponding Author.

Email: ghafarifar@modares.ac.ir

Tel: 0098 21 8288 4553

Fax: 0098 21 8288 3843

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences November, 2012; Vol. 16, No 5, Pages 406-413

Please cite this article as: Maroufi Y, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z, Hasan Z. A study on the cytotoxic effect of cantharidin on *Leishmania major* promastigote and amastigote survival in vitro. *Feyz* 2012; 16(5): 406-13.

بررسی اثر سایتوتوکسیک کانتاریدین بر بقای پروماستیگوت و آماستیگوت لیثمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی

یحیی معروفی^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، عبدالحسین دلیمی^۳، زهره شریفی^۴، زهیر حسن^۵

خلاصه:

سابقه و هدف: لیثمانیوزیس جلدی از مشکلات عمده سلامت در بسیاری از کشورها است. کانتاریدین جزو ترکیبات ترپنوئیدی است که در سوسک‌های خانواده Oedemeridae و Meloidae وجود داشته و ماده‌ای تاول‌زاست. در طب سنتی کانتاریدین برای درمان زگیل به کار رفته است. هدف از این مطالعه تعیین اثر سایتوتوکسیک کانتاریدین بر بقای پروماستیگوت و ماکروفاژ آلوده به انگل لیثمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر با طراحی تجربی و با دوز ۱۰^۶ انگل در میلی‌لیتر و ۱۰^۵ ماکروفاژ آلوده به انگل صورت گرفت. اثر کانتاریدین با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بر بقای پروماستیگوت و آماستیگوت لیثمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی پس از گذشت ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت، با روش MTT تعیین شد.

نتایج: کانتاریدین با غلظت ۵۰ μg/mL و ۰/۵ μg/mL پس از ۷۲ ساعت در پروماستیگوت‌ها به ترتیب ۴۹/۸۶ درصد و ۱۴/۲۶ درصد کشندگی داد. میزان کشندگی کانتاریدین با غلظت ۵۰ μg/mL پس از ۷۲ ساعت در ماکروفاژ آلوده به لیثمانیا ماژور ۲۹/۹۷ درصد و کانتاریدین با غلظت ۰/۵ μg/mL، ۲/۳۳ درصد بود. درصد کشندگی کانتاریدین با غلظت ۵۰ μg/mL و ۰/۵ μg/mL پس از ۷۲ ساعت در ماکروفاژهای غیرآلوده به ترتیب ۲۲/۸۶ و ۱۵/۲۳ بود.

نتیجه‌گیری: کانتاریدین بر روی پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور و ماکروفاژهای آلوده به انگل اثر کشندگی دارد. توصیه می‌شود که تحقیقات بیشتری در شرایط درون‌تنی جهت بررسی اثربخشی این ترکیب شیمیایی انجام شود.

واژگان کلیدی: کانتاریدین، لیثمانیا ماژور، پروماستیگوت، آماستیگوت، سایتوتوکسیک

— ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۱، صفحات ۴۱۳-۴۰۶

مقدمه

در لیثمانیازیس جلدی در محل نیش پشه، زخمی به وجود می‌آید که از چند ماه تا یک سال باقی خواهد ماند. درمان لیثمانیازیس شامل ترکیبات آنتیموان (پنتوستام و گلوکانتیم) است. علاوه بر عوارض این داروها احتمال عود بیماری نیز وجود دارد [۲،۱]. کانتاریدین اولین بار در سال ۱۸۱۰ توسط Robiquet از سوسک *Lytta vesicatoria* جدا و نامگذاری گردید [۴]. کانتاریدین جزو ترکیبات ترپنوئیدی است که در سوسک‌های خانواده Meloidae و Oedemeridae وجود دارد. از آنجا که کانتاریدین ماده‌ای تاول‌زا است، سوسک‌های میلوئیده را سوسک‌های تاول‌زا گویند [۵]. کانتاریدین حدود ۲۰۰۰ سال پیش در چین به‌عنوان دارو به کار رفته است. در آسیا برای درمان کورک، بواسیر، زخم و ضایعات پوستی استفاده می‌شده است. هم‌چنین، به‌عنوان عاملی برای سقط جنین، رفع ناتوانی جنسی در مردان و درمان سرطان از کانتاریدین خوراکی استفاده شده است. از صد سال پیش هم از آن برای درمان زگیل استفاده شده است [۶]. حکیم جرجانی سوسک تاول‌زا (ذراویج) را برای درمان زگیل، پیسی، ریزش مو، درمان هاری، ورم شکم و سیاه شدن ناخن شرح داده است. هم‌چنین، مسمومیت ناشی از این سوسک‌ها را به‌صورت اختلالات دستگاه

سازمان بهداشت جهانی لیثمانیازیس را جزو ده بیماری مهم دنیا معرفی کرده است. این بیماری به سه شکل جلدی، جلدی-مخاطی و احشائی وجود دارد. حدود ۱۲ میلیون نفر در ۸۸ کشور دنیا به لیثمانیازیس مبتلا بوده و سالانه دو میلیون مورد جدید بیماری گزارش می‌شود [۲،۱]. در ایران سالانه بیش از ۳۰ مورد در صدهزار نفر جمعیت رخ می‌دهد [۳].

^۱ فارغ التحصیل دکتری، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ دانشیار، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ استاد، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ استادیار، گروه ویروس شناسی، سازمان انتقال خون

^۵ استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، تقاطع بزرگراه آل احمد و چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی

تلفن: ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۳ | دورنویس: ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۴۱

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۵ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۸/۲۲

یک میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شده و به - عنوان محلول استوک در یخچال نگهداری شد. غلظت‌های $50 \mu\text{g/mL}$ و 20 ، 10 ، 5 ، 2 ، 1 ، 0.5 از استوک با محیط کشت RPMI 1640 تهیه شده و در یخچال نگهداری شد [۲۱].

۳-۲. تعیین درصد زنده بودن پروماستیگوت تعداد 10^6 انگل در مرحله لگاریتمی توسط لام نئوبار شمارش شده و در پلیت کشت ۹۶ خانه در محیط RPMI 1640 و سرم جنین گاوی 10 درصد کشت داده شد [۲۱، ۲۲]. کانتاریدین با غلظت نهایی $50 \mu\text{g/mL}$ و 20 ، 10 ، 5 ، 2 ، 1 ، 0.5 به چاهک‌ها (به صورت سه تایی با سه تکرار) افزوده شد. چاهک‌ها در سه زمان 72 و 48 ، 24 ساعت با روش [3-(4, 5-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] MTT طبق دستورالعمل کیت، پودر MTT با غلظت $5 \mu\text{g/mL}$ در PBS حل شده و از فیلتر 0.2 عبور داده شد. به هر چاهک $20 \mu\text{L}$ افزوده و سپس پلیت در دمای 37°C و تاریکی به مدت $2-5$ ساعت انکوبه شد. رنگ در داخل میتوکندری سلول زنده در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز تبدیل به کریستال‌های نامحلول به نام فورمازان می‌شود. پس از گذشت $2-5$ ساعت پلیت با دور rpm 2500 به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته می‌شود. سپس به هر چاهک $100 \mu\text{L}$ DMSO به عنوان حل کننده فورمازان افزوده شد. پس از 10 دقیقه جذب نوری آنها در طول موج 540 nm خوانده شد. درصد زنده بودن سلول از طریق فرمول $100 \times (AC-AB)/(AT-AB)$ محاسبه شد. AB جذب نوری چاهک بلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با کانتاریدین است.

۴-۲. تعیین درصد زنده بودن آماستیگوت ماکروفاژهای صفاقی موش با تزریق 3 mL PBS استریل به صفاق موش Balb/c و کشیدن مایع صفاقی، سانتریفوژ با دور rpm 1500 به مدت 10 دقیقه و شستشو با PBS سرد جدا شدند [۲۲]. تعداد 10^6 ماکروفاژ در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی 10 درصد به همراه 100 U/mL پنی‌سیلین و $100 \mu\text{g/mL}$ استرپتومایسین کشت داده شد و در دمای 37°C با 5% CO_2 انکوبه شد. برای آلوده کردن ماکروفاژها تعداد 10^6 پروماستیگوت انگل در مرحله ایستایی به چاهک حاوی ماکروفاژ افزوده شد و در دمای 37°C و CO_2 5 درصد انکوبه شد. 6 ساعت بعد برای حذف ماکروفاژهای نجسبیده و پروماستیگوت وارد نشده به سلول، مایع

گوارش، دستگاه ادراری-تناسلی و سیستم عصبی توصیف کرده است [۷]. کانتاریدین به دلیل خاصیت دارویی و همچنین مسمومیت شدید در احشام اهمیت پزشکی و اقتصادی دارد [۸، ۶]. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که کانتاریدین به روش‌های زیر بر سلول‌ها اثر می‌گذارد؛ ۱- مهار پروتئین فسفاتاز ۱ و ۲A: پروتئین فسفاتازها از طریق فسفریلاسیون-دفسفریلاسیون در عملکردهای مختلف سلولی نقش دارند و هدایت سیگنال‌های وابسته به فسفریلاسیون را بر عهده دارند [۹-۱۱]. ۲- فعال کردن آپوپتوز: کانتاریدین باعث افزایش کاسپاز ۹ و ۸ می‌شود و هم‌زمان باعث کاهش میزان پروتئین Bcl 2 به عنوان عامل مهارکننده آپوپتوز می‌شود. ۳- بلوکه کردن تمام مهارکننده‌های کاسپاز [۱۳، ۱۲]. در برخی از مطالعات نشان داده شده است که کانتاریدین از طریق مسیر p53 باعث القای آپوپتوز می‌شود [۱۷-۱۴]. ۴- وقفه در چرخه سلولی در مرحله G2/M: کانتاریدین از طریق تشکیل دوک‌های غیر عادی تقسیم و تاخیر در تشکیل کروموزوم‌ها باعث توقف سلول در حال تکثیر در مرحله میتوز می‌شود [۱۸، ۱۴]. مطالعات کانتاریدین بر روی سلول‌های سرطانی انسان انجام شده است. مشخص شده است که کانتاریدین در سلول‌های هپاتوما، سلول‌های سرطانی کولون، کارسینوما حفره دهان و سلول‌های لوسمی باعث آپوپتوز می‌شود [۱۷، ۱۹، ۲۰]. این مطالعه به منظور تعیین اثر سایتوتوکسیک کانتاریدین بر بقای پروماستیگوت و ماکروفاژ آلوده به انگل در محیط برون‌تنی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است. گروه کنترل شامل پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور، ماکروفاژ غیرآلوده و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور بدون کانتاریدین و گروه تجربی شامل گروه‌های پروماستیگوت لیشمانیا ماژور، ماکروفاژ غیرآلوده و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور تیمار شده با دوزهای مختلف کانتاریدین بود.

۲-۱. کشت انگل

لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از موسسه رازی تهیه شد و در فلاسک‌های حاوی محیط کشت RPMI 1640 به همراه سرم جنین گاوی 10 درصد (GIBCO) غیرفعال شده با حرارت کشت داده شد و فلاسک‌ها در دمای 21°C انکوبه شدند.

۲-۲. تهیه غلظت‌های کانتاریدین

کانتاریدین از شرکت Sigma تهیه شد و با غلظت 20 درصد در

۲۲/۸۶ درصد و ۱۳/۰۱ درصد، ۰ درصد کشندگی داد (نمودار شماره ۲ و جدول شماره ۲). درصد کشندگی کانترایدین با غلظت ۰/۵ $\mu\text{g/mL}$ پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت در ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور به ترتیب ۲/۳۳ درصد و ۰/۵/۰۴ درصد بود. غلظت ۵۰ $\mu\text{g/mL}$ کانترایدین در ماکروفاژهای آلوده به انگل پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت به ترتیب ۲۹/۹۷ درصد و ۱۹/۹۵ درصد، ۱۰/۰۸ درصد کشندگی داد (نمودار شماره ۳ و جدول شماره ۳). آنالیز آماری میزان کشندگی پروماستیگوت‌ها نشان داد که در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، گروه کنترل با تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$). در گروه ماکروفاژ غیرآلوده پس از ۲۴ ساعت، کانترایدین بر ماکروفاژها اثر معنی‌داری نداشت ($P > ۰/۰۵$) ولی پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، کانترایدین اثر معنی‌داری را بر سایر گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل داشت ($P < ۰/۰۵$). پس از ۲۴ ساعت گروه کنترل (ماکروفاژ آلوده بدون کانترایدین) تنها با گروه‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ (ماکروفاژ آلوده+کانترایدین ۵۰ $\mu\text{g/mL}$ ، ماکروفاژ آلوده+کانترایدین ۲۰ $\mu\text{g/mL}$ و ماکروفاژ آلوده+کانترایدین ۱۰ $\mu\text{g/mL}$) اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$). پس از ۴۸ ساعت گروه کنترل با همه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت و پس از ۷۲ ساعت، گروه کنترل با همه گروه‌ها به جز گروه ۲ و ۳ (ماکروفاژ آلوده+کانترایدین ۰/۵ $\mu\text{g/mL}$ و ماکروفاژ آلوده+کانترایدین ۱ $\mu\text{g/mL}$) اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$).

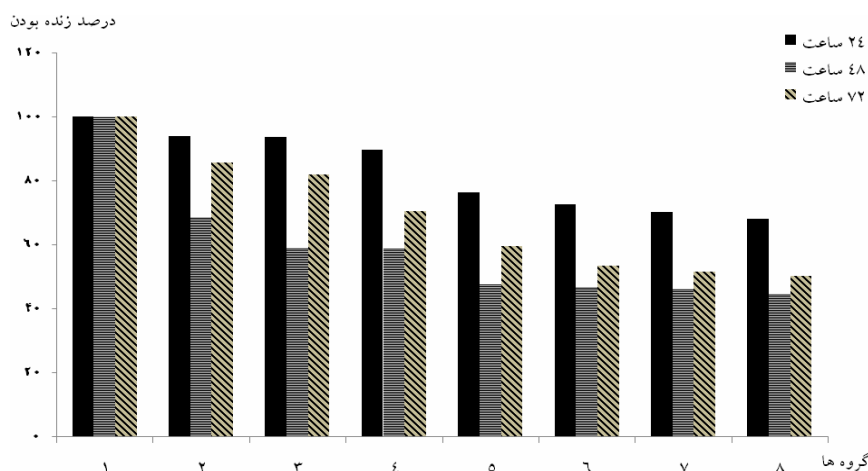
رویی چاهک دور ریخته شد و محیط کشت تازه اضافه گردید. مراحل MTT همانند مرحله قبل انجام شد، با این تفاوت که برای دور ریختن مایع رویی نیاز به سانتریفوژ نیست چون ماکروفاژ سلول چسبیده است.

۲-۵. آنالیز داده‌ها

برای مقایسه داده‌ها در گروه‌های مختلف پس از انجام تست نرمالیه کولموگروف اسمیرنوف از آزمون One-Way Repeated ANOVA Measures استفاده شد.

نتایج

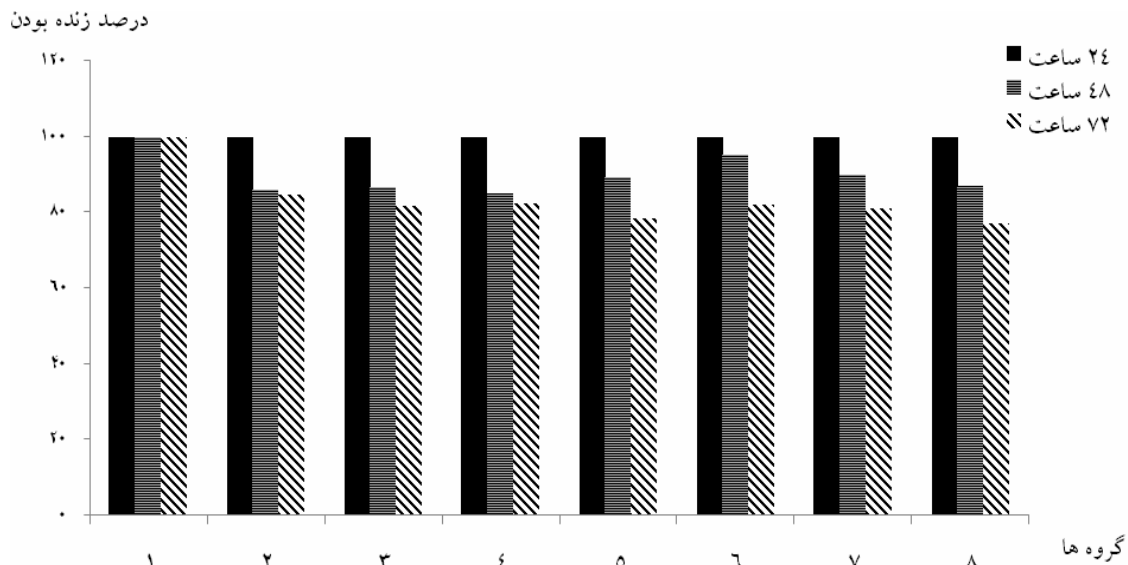
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کانترایدین با غلظت ۰/۵ $\mu\text{g/mL}$ پس از گذشت ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت در پروماستیگوت‌های لیشمانیا به ترتیب ۱۴/۲۶ درصد و ۳۱/۴۷، ۶/۲ درصد کشندگی داد، ولی غلظت ۵۰ $\mu\text{g/mL}$ پس از گذشت ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت به ترتیب ۴۹/۸۶ درصد و ۵۵/۵۴، ۳۲/۰۸ درصد کشندگی داد (نمودار شماره ۱ و جدول شماره ۱). درصد کشندگی کانترایدین با غلظت ۰/۵ $\mu\text{g/mL}$ پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت در ماکروفاژهای غیرآلوده به ترتیب ۱۵/۲۳ درصد و ۱۳/۸۳، ۰ درصد بود. غلظت ۵۰ $\mu\text{g/mL}$ کانترایدین در ماکروفاژهای غیرآلوده پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت به ترتیب



نمودار شماره ۱- درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور پس از مواجهه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانترایدین در زمان‌های ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت. ۱: گروه کنترل، ۲: لیشمانیا ماژور+کانترایدین ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۳: لیشمانیا ماژور+کانترایدین ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۴: لیشمانیا ماژور+کانترایدین ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۵: لیشمانیا ماژور+کانترایدین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۶: لیشمانیا ماژور+کانترایدین ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۷: لیشمانیا ماژور+کانترایدین ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۸: لیشمانیا ماژور+کانترایدین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.

جدول شماره ۱- میانگین درصد زنده بودن پروماستیگوت‌ها پس از مواجهه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

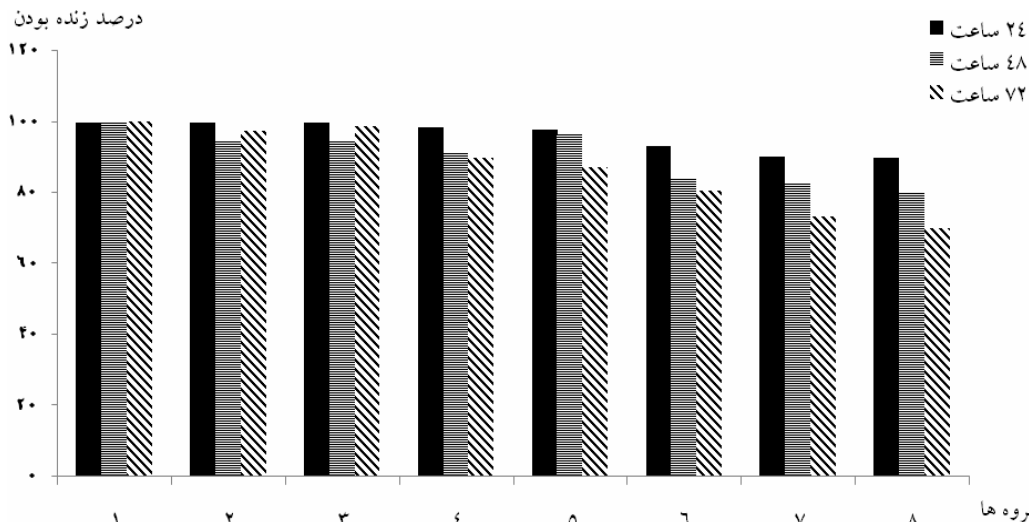
زمان (ساعت)	لیشمانیا مازور بدون (گروه کنترل)	لیشمانیا مازور+ ۰/۵µg/mL	لیشمانیا مازور+ ۱µg/mL	لیشمانیا مازور+ ۲µg/mL	لیشمانیا مازور+ ۵µg/mL	لیشمانیا مازور+ ۱۰µg/mL	لیشمانیا مازور+ ۲۰µg/mL	لیشمانیا مازور+ ۵۰µg/mL
۲۴	٪۱۰۰	٪۹۳/۸	٪۹۳/۶	٪۸۹/۵۱	٪۷۶/۱۶	٪۷۲/۴۲	٪۷۰/۲	٪۶۷/۹۲
۴۸	٪۱۰۰	٪۶۸/۵۳	٪۵۹/۰۱	٪۵۸/۷۸	٪۴۷/۴۴	٪۴۶/۷۲	٪۴۶/۱۱	٪۴۴/۴۶
۷۲	٪۱۰۰	٪۸۵/۷۴	٪۸۱/۸۸	٪۷۰/۳۱	٪۵۹/۴۲	٪۵۳/۴۵	٪۵۱/۴۷	٪۵۰/۱۴



نمودار شماره ۲- درصد زنده بودن ماکروفاژهای غیرآلوده پس از مواجهه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت. ۱: گروه کنترل، ۲: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۳: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۴: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۵: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۶: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۷: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۸: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.

جدول شماره ۲- میانگین درصد زنده بودن ماکروفاژهای غیرآلوده پس از مواجهه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	ماکروفاژ غیر آلوده بدون کانتاریدین (گروه کنترل)	ماکروفاژ غیر آلوده+ ۰/۵µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ ۱µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ ۲µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ ۵µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ ۱۰µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ ۲۰µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ ۵۰µg/mL
۲۴	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
۴۸	٪۱۰۰	٪۸۶/۱۷	٪۸۶/۵۸	٪۸۴/۹۵	٪۸۹/۴۳	٪۹۵/۱۲	٪۸۹/۹۵	٪۸۶/۹۹
۷۲	٪۱۰۰	٪۸۴/۷۷	٪۸۱/۶۳	٪۸۲/۴۴	٪۷۸/۳۶	٪۸۲/۰۴	٪۸۱/۲۲	٪۷۷/۱۴



نمودار شماره ۳- درصد زنده بودن ماکروفاژهای آلوده به آماسیتوگوت لیشمانیا ماژور پس از مواجهه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. ۱: گروه کنترل، ۲: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۳: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۴: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۵: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۶: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۷: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۸: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.

جدول شماره ۳- میانگین درصد زنده بودن ماکروفاژهای آلوده به آماسیتوگوت لیشمانیا ماژور پس از مواجهه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	ماکروفاژ آلوده بدون کانتاریدین (گروه کنترل)	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۰/۵ μg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۱ μg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۲ μg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵ μg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۱۰ μg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۲۰ μg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵۰ μg/mL
۲۴	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۹۸/۶۵	٪۹۷/۸۹	٪۹۳/۰۸	٪۹۰/۳۵	٪۸۹/۹۲
۴۸	٪۱۰۰	٪۹۴/۹۶	٪۹۱/۲۷	٪۹۶/۴۴	٪۸۴/۲۷	٪۸۰/۸۱	٪۷۳/۲۷	٪۸۰/۰۵
۷۲	٪۱۰۰	٪۹۷/۶۷	٪۹۸/۷۳	٪۸۹/۹۷	٪۸۷/۳۵	٪۸۰/۸۱	٪۷۳/۲۷	٪۷۰/۰۳

بحث

(۲۹/۹۷ درصد) در گروه مواجهه شده با کانتاریدین ۵۰ μg/mL پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد. در مطالعه غفاری فر [۲۱]، بیشترین میزان کشندگی در پروماستیگوت‌ها مربوط به غلظت ۵۰ μg/mL کانتاریدین پس از ۷۲ ساعت بود. هم‌چنین، میزان کشندگی پس از ۷۲ ساعت بیش از ۴۸ ساعت بود. در مطالعه مذکور تعیین درصد کشندگی با شمارش مستقیم به‌وسیله لام نئوبار انجام شده و میزان IC_{50} پس از ۲۴ ساعت ۲ μg/mL محاسبه شده است. در مطالعه حاضر پروماستیگوت‌های انگل در مرحله لگاریتمی شمارش و در پلیت کشت داده شده و بلافاصله کانتاریدین با غلظت‌های مختلف به چاهک‌ها افزوده شد و میزان کشندگی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط تست MTT محاسبه شد. ولی در مطالعه غفاری فر [۲۱] ۷۲ ساعت پس از کشت انگل در پلیت، کانتاریدین به چاهک‌ها افزوده شده است. نتایج ما نشان داد که میزان کشندگی پس از ۷۲ ساعت کمتر از ۴۸ ساعت است و در مطالعه ذکر شده این میزان

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کانتاریدین با غلظت‌های مشخص شده، بیشترین اثر کشندگی را پس از ۴۸ ساعت بر پروماستیگوت‌ها داشت. بیشترین میزان کشندگی در پروماستیگوت‌ها مواجهه شده با کانتاریدین ۵۰ μg/mL پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از میزان کشندگی کانتاریدین در پروماستیگوت‌ها کاسته شد. میزان IC_{50} پس از ۲۴ ساعت، ۳/۵ μg/mL محاسبه شد. در این تحقیق، کانتاریدین پس از ۲۴ ساعت بر ماکروفاژهای جدا شده از صفاق موش در شرایط بیرونی اثری نداشت. بیشترین میزان کشندگی (۲۲/۸۶ درصد) در گروه مواجهه شده با کانتاریدین ۵۰ μg/mL پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد. و این در حالی است که در مورد ماکروفاژهای آلوده به آماسیتوگوت انگل پس از ۲۴ ساعت کانتاریدین با غلظت بالاتر از ۱ μg/mL باعث کشندگی شد. بیشترین درصد کشندگی

می‌گیرد. هنوز مکانیسم دقیق القای آپوتوز در لیشمانیا به‌دنبال اثربخشی کانثاریدین مشخص نشده است. میلنفوسین در لیشمانیا دونوانی با کاهش نفوذپذیری غشای میتوکندری باعث افزایش رها شدن سیتوکروم C و در نهایت القای آپوتوز می‌شود [۲۵].

نتیجه‌گیری

کانثاریدین بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و ماکروفاژهای آلوده به انگل اثر کشندگی دارد. توصیه می‌شود که تحقیقات بیشتری در شرایط درون‌تنی جهت بررسی اثربخشی این ترکیب شیمیایی انجام شود.

تشکر و قدردانی

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

References:

- [1] Simranjeet K, Hitesh P, Virag S, Prabha G, Nilanjan R. *Leishmani major* structural database. *IJIB* 2009; 7(2): 63-8.
- [2] Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 363-70.
- [3] Athari A, Jalallou N. A five-year survey of cutaneous leishmaniasis in iran (2001-2006). *J Isfahan Med Sch* 2006; 82: 8-13. [in Persian]
- [4] Bonness K, V.Aragon I, Rutland B, Ofori-Acquah S, M.Dean N, anen REH. Cantharidin-induced mitotic arrest is associated with the formation of aberrant mitotic spindles and lagging chromosomes resulting, in part, from the suppression of PP2AA. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(11): 2727-36.
- [5] Meredith M. Chemistry of Drugs and Poisons. available at: <http://www.entiastate.edu/imagegal/coleoptera/blister/012135margblisbhtml2000>.
- [6] Moed L, Shwayde TA, Chang MW. Cantharidin Revisited A Blistering Defense of an Ancient Medicine. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1357-60.
- [7] Yousefi M. From blisters beetle untile cantharidin. *Darmangar* 2004; 3&4: 36-9 [in Persian].
- [8] Tagwireyi D, Ball DE, Loga PJ, Moyo S. Cantharidin poisoning due to "Blister beetle" ingestion. *Toxicon* 2000; 38: 1865-9.
- [9] LI YM, CASIDA JE. Cantharidin-binding protein: Identification as protein phosphatase 2A. *PNAS* 1992; 89: 11867-70.
- [10] Knapp J, Boknik P, Luss I, Huke S, Linck B, Luss H, et al. The Protein Phosphatase Inhibitor

در ۷۲ ساعت بیش از ۴۸ ساعت بود. در مطالعه ما پروماستیگوت‌ها در فاز لگاریتمی قرار داشتند و با وجود کانثاریدین در محیط به رشد خود ادامه دادند، ولی در مطالعه ذکر شده سرعت رشد انگل پس از سه روز کاهش یافت و افزودن کانثاریدین کشندگی را در پروماستیگوت‌ها بالا برد. ماکروفاژها نقش مهمی در ایجاد پاسخ ایمنی علیه عفونت‌ها و ترشح سایتوکاین‌ها دارند. لیشمانیا دونوانی و لیشمانیا ماژور از طریق حذف (Macrophage) M-CSF colony-stimulating factor مانع از القای آپوتوز در ماکروفاژ می‌شوند. همچنین، *L. major* مانع از رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری و در نتیجه فعال شدن کاسپاز ۳ ماکروفاژ آلوده می‌شود. لیشمانیا با این عمل به بقای خود در داخل میزبان کمک می‌کند [۲۴،۲۳]. کانثاریدین باعث افزایش کاسپاز ۳ می‌شود و هم‌زمان باعث کاهش میزان پروتئین Bel 2 به‌عنوان عامل مهارکننده آپوتوز شده و در نتیجه باعث القای آپوتوز می‌شود [۱۳،۱۲]. لیشمانیا فاقد سیستم کاسپاز است و آپوتوز در آن از طریق ملکول‌های شبیه کاسپاز بنام متاکاسپاز صورت

- Cantharidin Alters Vascular Endothelial Cell Permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289(3): 1480-6.
- [11] Kovacs P, Pinter M. Effects of phosphoprotein phosphates inhibitors (phenylarsine oxide and cantharidin) on Tetrahymena. *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 197-205.
- [12] Xiao-hua W, Yuan-qin Y, Cheng-guang S, Fan-dong M, Ping M, You-hong J. Inhibitory Effect of Cantharidin on Proliferation of A549 Cells. *Chin J Cancer Res* 2007; 19: 283—6.
- [13] Huan SKH, Lee HH, Liu DZ, Wu CC, Wang CC. Cantharidin-induced cytotoxicity and cyclooxygenase 2 expression in human bladder carcinoma cell line. *Toxicology* 2006; 223: 136—43.
- [14] Efferth T, Rauh R, Kahl S, Tomicic M, Bozhzelt H, Tome ME, et al. Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 811-8.
- [15] 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: 1811-8.
- [16] 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: 43-52.
- [17] Huh JE, Kang KS, Ahn KS, Kim DH, Saiki I, Kim SH. Mylabris phalerlata induces apoptosis by

caspase activation following cytochrome c release and Bid cleavage. *Life Sci* 2003; 73: 2249-62.

[18] 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: 77-87.

[19] 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): 1820-6.

[20] 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): 603-7.

[21] Ghaffarifar F. Leishmania major: In vitro and

in vivo anti-leishmanial effect of cantharidin. *Exp Parasitol* 2010; 126(2): 126-9.

[22] Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-Induced Apoptotic Cell Death on Leishmania major and L. tropica Strains. *Korean J Parasitol* 2011; 49(1): 17-23.

[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: 487-92.

[24] Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 1994; 152(6): 2930-7.

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