

Effect of aloe-emodin on growth and induction of apoptosis in *Leishmania major* promastigotes in vitro

Delavari M, Dalimi-Asl A*, Ghaffarifar F, Sadraei J

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

Received March 2, 2012; Accepted September 9, 2013

Abstract:

Background: Cutaneous leishmaniasis is an endemic disease in some parts of Iran. The use of pentavalent antimony compounds as first therapeutic choice is associated with limitations and several adverse effects and complications. This study aimed to evaluate the effect of aloe-emodin on *Leishmania major* promastigote growth in vitro conditions and also the effect of aloe-emodin on induction of apoptosis in *Leishmania major* promastigotes.

Materials and Methods: In this experimental study, different concentrations (40, 80, 120 and 160 µg/ml) of aloe-emodin were tested in three different times (24, 48 and 72h) on *Leishmania* promastigotes and the IC₅₀ was calculated by counting the number of parasites. The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay was used to determine the percentage of live promastigotes after adding aloe-emodin. Apoptosis at three different concentrations (40, 80 and 120 µg/ml) was evaluated by flowcytometry and also the percentages of early and late apoptosis and necrosis were determined.

Results: Result showed that aloe-emodin has an inhibitory effect on the growth of *Leishmania* promastigotes. The IC₅₀ value was 52.79µg/ml. Moreover, the results of flowcytometry showed that aloe-emodin induced the early and late apoptosis in *Leishmania* promastigotes.

Conclusion: Aloe-emodin shows an antileishmanial effects in vitro condition and regarding its herbal origin, it can be tested as the new drug in vivo studies.

Keywords: *Leishmania major*, Aloe-emodin, flow cytometry, Apoptosis, MTT

* Corresponding Author.

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Tel: 0098 21828 83838

Fax: 0098 21828 84555

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences November, 2013; Vol. 17, No 5, Pages 422-428

Please cite this article as: Delavari M, Dalimi-Asl A, Ghaffarifar F, Sadraei J. Effect of aloe-emodin on growth and induction of apoptosis in *Leishmania major* promastigotes in vitro. *Feyz* 2013; 17(5): 422-8.

تاثیر آلوده امودین بر رشد و القای آپوپتوز در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

مهدی دلاوری^۱، عبدالحسین دلیمی^{۲*}، فاطمه غفاری فر^۳، جاوید صدرایی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: لیشمانیازیس جلدی یکی از بیماری‌های اندمیک در برخی از مناطق ایران است. استفاده از ترکیبات آنتی‌موان پنج ظرفیتی به عنوان داروهای خط اول درمان، با محدودیت‌ها و عوارض جانبی متعددی همراه می‌باشد. از این رو، همواره تلاش برای یافتن روش‌های درمانی جدید و مؤثر مورد نظر است. در پژوهش حاضر تاثیر آلوده امودین بر رشد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین تاثیر آلوده امودین در روند القا آپوپتوز در پروماستیگوت‌های انگل سنجیده شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی غلظت‌های مختلف (۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از آلوده امودین در سه زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر پروماستیگوت‌های انگل تاثیر داده شده و با استفاده از شمارش تعداد انگل IC50 محاسبه شد. هم‌چنین برای تعیین درصد پروماستیگوت‌های زنده پس از افزودن آلوده امودین از روش MTT استفاده شد. در ادامه با استفاده از آزمون فلوسایتومتري میزان آپوپتوز در سه غلظت (۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بررسی شده و درصد آپوپتوز اولیه، تاخیری و نکروز مشخص شد.

نتایج: آلوده امودین دارای اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد پروماستیگوت‌های انگل است و میزان IC50 ۵۲/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. هم‌چنین، نتایج حاصل از آزمون فلوسایتومتري نشان داد که آلوده امودین باعث القای آپوپتوز اولیه و تاخیری در پروماستیگوت لیشمانیا ماژور می‌شود.

نتیجه‌گیری: آلوده امودین دارای اثرات ضد لیشمانیایی بوده و با توجه به اینکه ماده‌ای با منشأ گیاهی است، می‌تواند به‌عنوان دارویی جدید در بررسی‌های درون‌تنی مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لیشمانیا ماژور، آلوده امودین، فلوسایتومتري، آپوپتوز، MTT

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۲، صفحات ۴۲۸-۴۲۲

مقدمه

زخم سالک چندان مشکل آفرین نبوده و اغلب ضایعات آن خود به‌خود بهبود می‌یابند، ولی به دلایل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم، بد شکل بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه ارائه روش درمانی آسان، قابل تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به‌نظر می‌رسد [۷،۶]. مطالعه بر روی گیاهان دارویی جهت یافتن دارویی مناسب علیه انگل لیشمانیا و بیماری لیشمانیازیس از اهمیت بالایی برخوردار است [۸]. آلوده امودین یکی از ترکیبات اصلی و موثر گیاه آلوده‌ورا می‌باشد که در عصاره برگ این گیاه وجود دارد و دارای اثر ضد سرطانی است. آلوده‌ورا نام گیاهی است از سرده سیگل‌ها (Aloe)، راسته مارچوبه‌ای‌ها (Asparagales) و تیره سریشیان (Asphodela-ceae) که بومی آفریقای شمالی است. آلوده‌ورا واجد ویژگی‌های مهم درمانی از جمله تقویت و تعدیل سیستم ایمنی در بیماری‌های التهابی و ویروسی (مثل تبخال)، ترمیم زخم، ترمیم آسیب‌های ناشی از سوختگی و اثرات ضد التهابی است [۹،۱۰]. نخستین بار مصری‌ها این گیاه را برای درمان زخم‌ها، سوختگی و عفونت به‌کار گرفتند. از دهه ۱۹۳۰ به بعد تحقیقات علمی وسیعی بر روی ترکیبات و خواص دارویی این گیاه انجام شد و دریافتند عصاره صاف شده این گیاه تاثیر زیادی در درمان زخم‌ها و سوختگی‌ها

عامل لیشمانیازیس تک یاخته انگلی از خانواده تریپانوزو-ماتیده، بنام لیشمانیا است. این بیماری در پنج قاره و ۸۱ کشور جهان به‌صورت اندمیک وجود دارد. سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون مورد جدید از بیماری در جهان گزارش می‌شود. لیشمانیازیس به سه شکل بالینی جلدی، جلدی‌مخاطی و احشایی وجود دارد [۲،۱]. در فرم جلدی علائم بالینی به شکل زخمی است که از چند هفته تا چند ماه پس از آلوده شدن شخص سر باز می‌کند [۳]. برای درمان از ترکیبات آنتی‌موان استفاده می‌شود، ولی این ترکیبات دارای عوارض هستند و مقاومت دارویی و نیز عود بیماری پس از درمان وجود دارد [۴،۵].

^۱ دانشجوی دکترای تخصصی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

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

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

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۸۳۸، دورنویس: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۵۵

پست الکترونیک: dalimi_a@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۶/۱۸

دارد [۱۱،۱۰]. وجود آلكالوئیدها، تری‌ترین‌ها، سیانیدین‌ها، پروآنتی‌سیانیدین‌ها، تانن‌ها، ساپونین و استروئیدها در عصاره این گیاه اثبات شده است که حضور این مواد می‌تواند اثرات ضد انگلی گیاه را توجیه کند [۱۰،۹]. در سال ۲۰۱۱ توسط Fernanda و همکارانش اثر آلوئه ورا بر روی لیشمانیا اینفانتوم بررسی شد و غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ از دارو به میزان ۶۵ درصد از رشد انگل ممانعت کرد [۱۲]. محققین غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۲۲۵ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آلوئه‌ورا را بر لیشمانیا دونووانی اثر دادند و مشاهده نمودند که غلظت $300 \mu\text{g/ml}$ بیش از ۸۰ درصد از رشد انگل ممانعت می‌نماید [۱۴،۱۳]. آلوئه امو دین یکی از ترکیبات اصلی و موثر برگ گیاه آلوئه ورا می‌باشد که فعالیت ضد توموری آن بر روی سلول‌های لوسمی [۱۵]، سلول‌های هپاتوما [۱۶] و سلول‌های پرومیلولوسمیک [۱۷] گزارش شده است. آلوئه امو دین با تغییر در میزان پروتئین‌های BAX، BCL2 و FACL [۱۸]، افزایش سیتوکروم C [۱۹] و فعال کردن caspase3,8,9 [۱۸،۱۹] باعث القای آپوپتوز می‌شود. تا به حال مطالعه‌ای جامع جهت بررسی تاثیر آلوئه امو دین بر انگل لیشمانیا ماژور انجام نشده است. در مطالعه حاضر اثر بخشی آلوئه امو دین بر پروماستیگوت-های لیشمانیا ماژور و القای آپوپتوز به‌واسطه این ماده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر مطالعه‌ای تجربی است. آلوئه امو دین به صورت پودر از شرکت Selleckchem خریداری شد و محلول استوک به غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر DMSO تهیه شد و با استفاده از محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شده و ابتدا در محیط NNN کشت داده شد. در ادامه جهت افزایش تعداد انگل، پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط RPMI 1640 کشت داده شدند.

بررسی میزان اثر بخشی دارو بر اساس شمارش تعداد انگل

پروماستیگوت‌های انگل در محیط RPMI 1640 حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شدند و زمانی که تعداد پروماستیگوت به 1×10^6 انگل در هر میلی‌لیتر رسید، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مذکور در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. آلوئه امو دین در غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از

اضافه کردن دارو تعداد انگل شمارش شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. هم‌چنین، در هر پلیت سه چاهک فقط دارای پروماستیگوت و محیط بوده و فاقد آلوئه امو دین بود که این چاهک‌ها به‌عنوان کنترل آزمون در نظر گرفته شدند [۲۰]. IC_{50} آلوئه امو دین پس از ۲۴ ساعت با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 5 محاسبه شد.

بررسی فعالیت کشندگی آلوئه امو دین بر پروماستیگوت‌ها به‌وسیله آزمایش MTT

پروماستیگوت‌های انگل در محیط RPMI 1640 حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شدند و زمانی که تعداد پروماستیگوت به 1×10^6 انگل در هر میلی‌لیتر رسید، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مذکور در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. به چهار چاهک پلیت ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد تا از تبخیر در چاهک‌های حاوی سلول جلوگیری به-عمل آورد. در سه چاهک مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI 1640+۱۰ درصد سرم جنین گاوی ریخته شده و به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن آلوئه امو دین به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول (3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide] MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و پس از انجام مراحل پایانی، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (ELISA reader; DA 3200) خوانده شد و نتایج آزمایش به‌صورت OD محاسبه گردید. درصد زنده بودن سلول از طریق فرمول زیر محاسبه شد: AB جذب نوری چاهک پلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با دارو است.

$$100 \times \frac{[AT-AB]}{[AC-AB]} = \text{درصد سلول‌های زنده} [21].$$

بررسی القا آپوپتوز پس از افزودن دوزهای مختلف دارو به‌وسیله فلوسایتومتری

در این آزمون از کیت Annexin V-FITC Apoptosis Detection (Biovision; USA) استفاده شد. انگل‌های مواجه شده با غلظت‌های مختلف آلوئه امو دین جمع-آوری شده و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه (به‌مدت ۵ دقیقه) سانتریفوژ شدند. پس از حذف مایع رویی به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر از بافر بایندینگ (Binding)، ۵ میکرولیتر از محلول Annexin-V و نیز ۵ میکرولیتر از محلول PI اضافه شد و سوسپانسیون به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد [۲۲]. شدت رنگ جذب شده توسط سلول‌ها با استفاده از دستگاه BD FACSCanto II Flow cytometer در گروه

آزمون MTT

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با دارو ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت با استفاده از آزمون MTT محاسبه شد. نتایج در جدول شماره ۲ آورده شده است. ۷۲ ساعت پس از کشت در بالاترین غلظت (۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ۱۹/۷ درصد سلول‌ها زنده ماندند.

بررسی آپوپتوز در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور با استفاده از فلوسایتومتری

آنالیز نتایج نشان داد که آلوده امودین باعث آپوپتوز اولیه و تاخیری در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود. ۲۴ ساعت پس از کشت در غلظت ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد سلول‌های دچار آپوپتوز (اولیه و تاخیری) ۶۸/۳ بود که از این میزان ۴۷/۱ درصد تنها آنکسین مثبت بودند و ۲۱/۲ درصد آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت بودند؛ در حالی که در گروه کنترل مقدار کل آپوپتوز ۰/۴ درصد بود. هم‌چنین بیشترین میزان آپوپتوز اولیه و تاخیری (۷۴/۱ درصد)، ۷۲ ساعت پس از کشت در غلظت ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شد (تصویر شماره ۱).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آلوده امودین باعث کاهش تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود. مقایسه تعداد انگل در گروه کنترل با گروه‌های تست در زمان‌های مختلف نشان داد که اثر بخشی آلوده امودین بر پروماستیگوت‌های انگل وابسته به غلظت و زمان می‌باشد و با افزایش غلظت آلوده امودین و زمان تأثیر، تعداد انگل نیز کاهش می‌یابد. ۲۴ ساعت پس از کشت بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی از رشد انگل در غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیده شد که تعداد انگل ۳۱۰۰۰۰ شمارش شد؛ در حالی که در گروه کنترل این مقدار ۱۲۵۰۰۰۰ بود. با استفاده از نتایج شمارش انگل IC50 آلوده امودین ۲۴ ساعت پس از کشت ۵۲/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. مقادیر به‌دست آمده از آزمون MTT نیز نشان داد درصد پروماستیگوت‌های زنده با افزایش غلظت آلوده امودین و زمان تأثیر کاهش می‌یابد. کمترین درصد سلول‌های زنده ۷۲ ساعت پس از کشت در غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیده شد.

ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس خوانده شد و در نهایت نتایج توسط نرم افزار FlowJo آنالیز شد. لازم به ذکر است نمونه‌های کشت داده شده با آلوده امودین پس از ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ برای آزمایش‌های فلوسایتومتری جمع‌آوری شدند. درصد سلول‌های دچار آپوپتوز اولیه شده (آنکسین مثبت)، سلول‌های دچار آپوپتوز تاخیری (آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت)، سلول‌های دچار نکروز شده (پروپیدیوم یداید مثبت) و سلول‌های زنده (آنکسین و پروپیدیوم یداید منفی) در سه غلظت ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلوده امودین و در سه زمان مذکور تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز و مقایسه نتایج ابتدا آزمون نرمالیت کولمو-گروفسمیرنوف انجام شد و سپس از آزمون t برای مقایسه نتایج گروه‌های تست با گروه کنترل استفاده شد.

نتایج

پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل، شمارش تعداد انگل نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف آلوده امودین با گذشت زمان تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد که تعداد آنها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱). IC50 آلوده امودین پس از ۲۴ ساعت ۵۲/۷۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار تعداد پروماستیگوت‌ها در آزمون ممانعت از رشد انگل

آلوده امودین (میکروگرم بر میلی لیتر)	تعداد پروماستیگوت ($10^6 \times$)		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۴۰	۰/۷۵±۰/۰۴	۰/۶۲±۰/۰۱	۰/۵۸±۰/۰۴
۸۰	۰/۵۱±۰/۰۳	۰/۴۹±۰/۰۲	۰/۴۳±۰/۰۳
۱۲۰	۰/۳۷±۰/۰۱	۰/۳۴±۰/۰۴	۰/۳۲±۰/۰۴
۱۶۰	۰/۳۱±۰/۰۱	۰/۲۸±۰/۰۳	۰/۲۵±۰/۰۲
کنترل	۱/۲۵±۰/۰۱	۱/۳۷±۰/۰۱	۱/۵±۰/۰۲

نتایج فوق میانگین سه بار تکرار است. اختلاف بین تعداد انگل در گروه‌های تست با گروه کنترل (گروه دارای انگل و فاقد آلوده امودین) معنی‌دار است ($P < 0.05$).

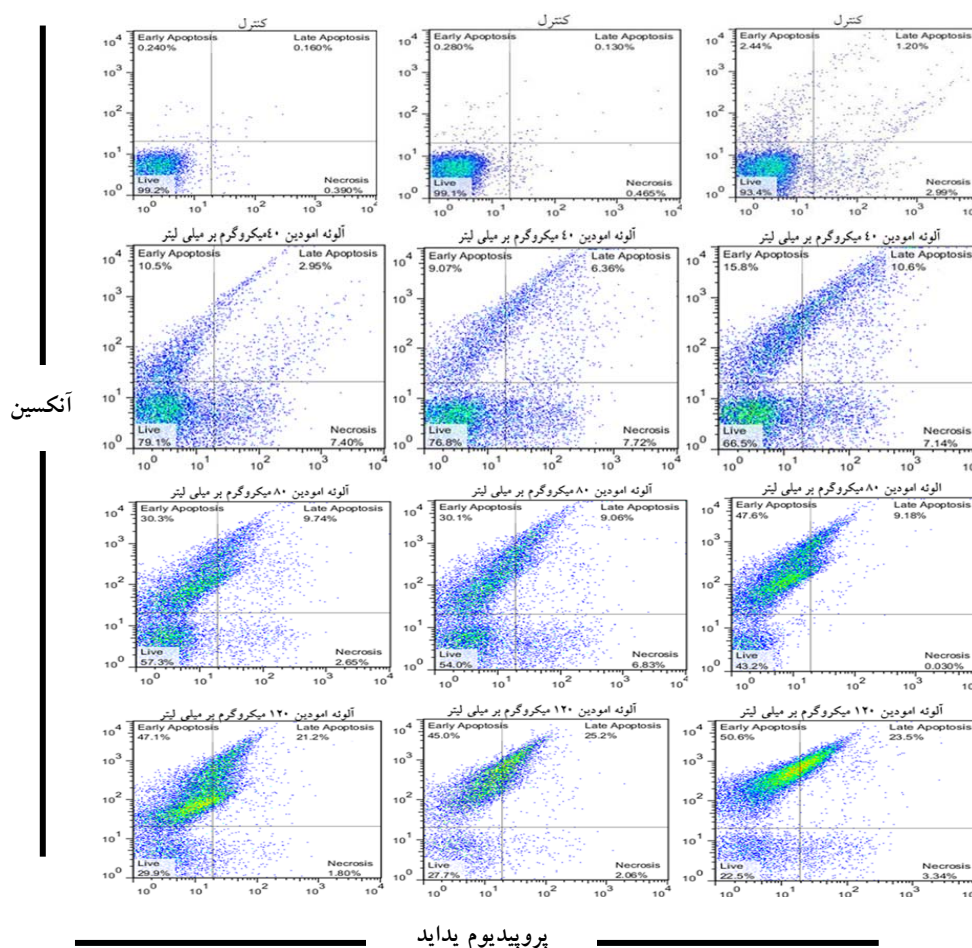
جدول شماره ۲- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از مواجهه با دارو

آلوده امودین (میکروگرم بر میلی لیتر)	درصد پروماستیگوت‌های زنده		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۴۰	۵۷	۴۶	۴۲
۸۰	۴۱	۳۹	۳۷/۵
۱۲۰	۳۶/۴	۳۰	۲۷/۱
۱۶۰	۲۴/۲	۲۲/۳	۱۹/۷

۲۴ ساعت

۴۸ ساعت

۷۲ ساعت



تصویر شماره ۱- نتایج فلوسایتومتری در لیشمانیا مازور پس از افزودن غلظت‌های مختلف آلونه امودین در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت. با افزایش زمان و غلظت آلونه امودین القا آپتوز (اولیه و تاخیری) در پروماستیگوت‌های انگل افزایش یافت. در تصویر درصد سلول‌های زنده، آپتوز اولیه، آپتوز تاخیری و نکروز در چهار منطقه مجزا نشان داده شده است.

آنکسین متصل می‌شود و در ادامه سلول‌هایی که دچار تخریب بیشتری شده‌اند دزوکسی ریبونوکلیک اسید (DNA) آنها به پروپیدیوم یداید متصل می‌شود و انگل به هر دو رنگ پاسخ مثبت می‌دهد. مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته بیشتر در مورد بررسی نقش ضد سرطانی آلونه امودین است. آلونه امودین در سلول‌های سرطانی رحم چرخه سلولی را در مرحله G2/M متوقف کرده و باعث فعال شدن آکالان فسفاتاز می‌شود [۲۳]. هم-چنین، در سلول‌های سرطانی معده با آزاد کردن سیتوکروم C و فعال کردن کاسپاز-۳ باعث القای آپتوز می‌شود [۲۴]. در سلول‌های سرطانی مغز نیز با تغییر در ایزوآنزیم‌های پروتئین کیناز C از تکثیر سلولی ممانعت کرده و آپتوز را القا می‌کند [۲۵]. در مطالعات گذشته القای آپتوز در لیشمانیا با استفاده از داروی میتوفوسین بررسی شده است [۲۶]. هم‌چنین، القای آپتوز توسط

یافته‌های تحقیق نشان داد که آلونه امودین باعث رخداد آپتوز در پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور می‌شود که این اثر وابسته به غلظت دارو و زمان می‌باشد؛ به گونه‌ای که با افزایش غلظت و زمان اثرگذاری آلونه امودین میزان آپتوز هم افزایش می‌یابد. بیشترین میزان آپتوز در غلظت ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۲ ساعت پس از کشت رخ داد که ۵۰/۶ درصد آپتوز اولیه و ۲۳/۵ درصد آپتوز تاخیری بود. نتایج فلوسایتومتری نشان می‌دهد که در هر غلظت استفاده شده از آلونه امودین با افزایش زمان، میزان آپتوز تاخیری افزایش می‌یابد؛ در واقع با گذشت زمان درصد سلول‌هایی که اتصال آنها به هر دو رنگ آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت باشند، افزایش می‌یابد که این امر نشان‌دهنده روند تاثیر گذاری آلونه امودین بر ساختمان سلولی انگل است. در ابتدای روند آپتوز فسفاتیدیل سرین موجود در غشا سلول به

این رو، انجام مطالعات بیشتر در شناسایی مکانیزم دقیق اثر بخشی این ماده و نیز مطالعات درون تنی می تواند در دست یابی به دارو و یا ترکیبات دارویی مناسب در درمان لیشمانیازیس جلدی مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان نامه دانشجویی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مقاله به خاطر تامین هزینه های طرح مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می دارند.

References:

- [1] Simranjeet K, Hitesh P, Virag S, Prabha G, Nilanjan R. *Leishmania major* structural database. *IJIB* 2009; 7(2): 63-8.
- [2] Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 363-70.
- [3] Pearson RD and Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1-13.
- [4] Pujals G, Suñé-Negre J, Pérez P, García E, Portus M, Tico J, et al. In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* 2008; 102: 1243-7.
- [5] Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002; 8(4): 319-42.
- [6] Berman JD. Human leishmaniasis: clinical Diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 684-703.
- [7] Brodskyn C, De Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 705-17.
- [8] Patrícia SL, Tatiana ST, Luis Gustavo M, Paloma K M, Nakamura T, Benedito, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L. amazonensis)* and *Trypanosoma cruzi*. *RBCF* 2005; 41: 85-94.
- [9] Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 3-37.
- [10] Nari Y, Chan-Ho L, Sun-Mee L. Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1341-8.
- [11] Choi S, Son W, Son Y. W, Park Y, Lee S, Chung M. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. *Br J Dermatol* 2001; 145: 535-45.
- [12] Fernanda C, Bevilacqua C, Accioly M, Morais S, Andrade H, Machado L, et al. In vitro effect of Aloe vera, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on

گیاه *Allium sativum* بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور با استفاده از فلوسایتومتري اثبات شده است [27]. محققين هندی نشان دادند که عصاره گیاه آلوئه ورا در روند اثر بخشی بر پرو-ماستیگوت های لیشمانیا دونوانی باعث القای آپوپتوز در این انگل می شود [28]. مکانیسم القای آپوپتوز در پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به واسطه آلوئه امودین هنوز مشخص نیست.

نتیجه گیری

آلوئه امودین بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور اثر کشندگی داشته و نیز باعث القای آپوپتوز در انگل می شود. از

- murine monocytic cells. *Vet Parasitol* 2011; 178: 235-40.
- [13] Avijit D, Goutam M, Chitra, Mitali C. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: A potential herbal therapy in leishmaniasis. *Glycoconj J* 2007; 24: 81-6.
 - [14] Avijit D, Debjani S, Ameenah G, Chitra M, Mitali C. In vitro and in vivo activity of Aloe vera leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2008; 102: 1235-42.
 - [15] Chen HC, Hsieh WT, Chang WC, Chung JC. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(8): 1251-7.
 - [16] Kuo P, Lin T, Lin C. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53 dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci* 2002; 71: 1879-92.
 - [17] Chen Y, Shen S, Lee W, Hsu F, Lin H, Ko C, et al. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1713-24.
 - [18] Lee H, Hsu S, Liu M, Wu C. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 287-95.
 - [19] Lee H. Protein kinase C involvement in aloe-emodin and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 11-20.
 - [20] Ebrahimsadr P, Ghaffarifar F, Hassan ZM, Beheshti N. The effect of artemether-induced apoptosis in promastigotes of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) under in-vitro conditions. *Modares J Med Sci Pathol* 2012; 15(2): 1-10.
 - [21] Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosin induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 2007; 116: 1-13.
 - [22] Marufi Y, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z, Hassan ZM. Cantharidin-induced apoptosis in

Leishmania major promastigotes and macrophages infected by *Leishmania major* amastigotes in-vitro. **J Mazandaran Univ Med Sci** 2012; 22(87): 33-40.

[23] Xiao B, Guo J, Liu D, Zhang S. Aloe-emodin induces in vitro G2/M arrest and alkaline phosphatase activation in human oral cancer KB cells. **Oral Oncology** 2007; 43(9): 905-10.

[24] Chen SH, Lin KY, Chang CC, Fang CL, Lin CP. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. **Food Chem Toxicol** 2007; 45(11): 2296-230.

[25] Acevedo-Duncan M, Russell C, Patel S, Patel R. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. **Int Immunopharmacol** 2004; 4(14):

1775-84.

[26] Caroline P, Philippe ML, Christian B, Jaqueline B. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother** 2004; 48(3): 852-9.

[27] Khademvatan SH, Saki J, Gharavi MJ and Rahim F. Allium sativum extract induces apoptosis in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) promastigotes. **J Med Plant Res** 2011; 5(16): 3725-32.

[28] Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J Med Microbiol** 2007; 56: 629-36.