Original Article

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

Maroufi Y[1], Ghaffarifar F[1*], Dalimi A[1], Sharifi Z[2], Hasan Z[3]

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 µg/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 50µg/mL and 0.5µg/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: ghafarif@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 لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی

یحیی معروفی [۱]، فاطمه غفاری فر [۲*]، عبدالحسین دلیمی [۳]، زهره شریفی [۴]، زهیر حسن [۵]

خلاصه:

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

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر با طراحی تجربی و با دوز 10^6 انگل در میلی‌لیتر و 10^5 ماکروفاژ آلوده به انگل صورت گرفت. اثر کانتاریدین با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بر بقای پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا ماژوز در شرایط برون‌تنی پس از گذشت ۷۲ و ٤٨، ٢٤ ساعت، با روش MTT تعیین شد.

نتایج: کانتاریدین با غلظت $\mu g/mL$ ۵۰ و $\mu g/mL$ ۰/۵ پس از ۷۲ ساعت در پروماستیگوت‌ها به‌ترتیب ٤٩/٨٦ درصد و ١٤/٢٦ درصد کشندگی داد. میزان کشندگی کانتاریدین با غلظت $\mu g/mL$ ۵۰ پس از ۷۲ ساعت در ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا ماژور ۲۹/۹۷ درصد و کانتاریدین با غلظت $\mu g/mL$ ۰/۵، ۲/۳۳ درصد بود. درصد کشندگی کانتاریدین با غلظت $\mu g/mL$ ۵۰ و $\mu g/mL$ ۰/۵ پس از ۷۲ ساعت در ماکروفاژهای غیرآلوده به‌ترتیب، ٢٢/٨٦ و ١٥/٢٣ بود.

نتیجه‌گیری: کانتاریدین 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.

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

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۱، صفحات ٤١٣-٤٠٦

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی لیشمانیازیس 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 لیشمانیازیس 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].

در لیشمانیازیس جلدی در محل نیش پشه، زخمی به‌وجود می‌آید که از چند ماه تا یک سال باقی خواهد ماند. درمان لیشمانیازیس شامل ترکیبات آنتیموآن (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 vesicaoria* جدا و نامگذاری گردید [٤]. کانتاریدین جزو ترکیبات ترپنوئیدی است که در سوسک های خانواده Meloidae و Oedemeridae وجود دارد. از آنجا که کانتاریدین ماده‌ایی تاولزا است، سوسک‌های میلوئیده را سوسک‌های تاولزا گویند [۵]. کانتاریدین حدود ۲۰۰۰ سال پیش در چین به‌عنوان دارو به‌کار 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 [٦]. حکیم جرجانی سوسک تاولزا (ذراریح) 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

[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: ۸۲۸۸۴۵۵۳ ۰۲۱ **دورنویس:** ۸۲۸۸۳۸۴۱ ۰۲۱

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

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

گوارش، دستگاه ادراری-تناسلی و سیستم عصبی توصیف کرده است [۷]. کانتاریدین به‌دلیل خاصیت دارویی و هم‌چنین مسمویت شدید در احشام اهمیت پزشکی و اقتصادی دارد [۸،٦]. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که کانتاریدین به روش‌های زیر بر سلول‌ها اثر می‌گذارد؛ ۱- مهار پروتئین فسفاتاز ۱ و 2A: پروتئین فسفاتازها از طریق فسفریلاسیون-دفسفریلاسیون در عملکردهای مختلف سلولی نقش دارند و هدایت سیگنال‌های وابسته به فسفریلاسیون را بر عهده دارند [۱۱-۹]. ۲- فعال کردن آپوپتوز: کانتاریدین باعث افزایش کاسپاز ۹ و ۸، ۳ می‌شود و هم‌زمان باعث کاهش میزان پروتئین Bcl 2 به‌عنوان 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 القائ آپوپتوز می‌شود [۱۷-۱٤]. ٤- 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 [٤،۱۸]. بیشتر مطالعات کانتاریدین بر روی سول‌های سرطانی انسان انجام شده است. مشخص شده است که کانتاریدین در سلول‌های هپاتوما، سلول‌های سرطانی کولون، کارسینومای حفره دهان و سلول‌های لوسمی باعث آپوپتوز می‌شود [۲۰،۱۹،۱۷]. 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 تیمارشده 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 به‌همراه سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (GIBCO) غیرفعال شده با حرارت کشت داده شد و فلاسک‌ها در دمای ۲۱ °C انکوبه شدند.

۲-۲. تهیه غلظت‌های کانتاریدین

کانتاریدین از شرکت Sigma تهیه شد و با غلظت ۲۰ درصد در یک میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شده و به‌عنوان محلول استوک در یخچال نگهداری شد. غلظت‌های ۵۰ µg/mL و ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۰/۵ از استوک با محیط کشت RPMI 1640 تهیه شده و در یخچال نگهداری شد [۲۱].

۲-۳. تعیین درصد زنده بودن پروماستیگوت

تعداد 10^6 انگل در مرحله لگاریتمی توسط لام نئوبار شمارش شده و در پلیت کشت ۹٦ خانه در محیط RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شد [۲۱،۲۲]. کانتاریدین با غلظت نهایی ۵۰ µg/mL و ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۰/۵ به چاهک‌ها (به صورت سه تایی با سه تکرار) افزوده شد. چاهک‌ها در سه زمان ۷۲ و ٤۸ ،۲٤ ساعت با روش MTT [3-(4, 5-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی شدند. طبق دستورالعمل کیت، پودر MTT با غلظت ۵ µg/mL در PBS حل شده و از فیلتر ۰/۲ عبور داده شد. به هر چاهک ۲۰µL افزوده و سپس پلیت در دمای ۲۱°C و تاریکی به‌مدت ۲-۵ ساعت انکوبه شد. رنگ در داخل میتوکندری سلول زنده در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز تبدیل به کریستال‌های نامحلول به‌نام فورمازان می‌شود. پس از گذشت ۲-۵ ساعت پلیت با دور rpm ۲۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته می‌شود. سپس به هر چاهک 100µL DMSO به‌عنوان حل کننده فورمازان افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نوری آنها در طول موج ٥٤۰ nm خوانده شد. درصد زنده بودن سلول از طریق فرمول (AT-AB)/(AC-AB)×100 محاسبه شد. AB جذب نوری چاهک بلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با کانتاریدین است.

۲-٤. تعیین درصد زنده بودن آماستیگوت

ماکروفاژهای صفاقی موش با تزریق ۳ mL PBS استریل به صفاق موش Balb/c و کشیدن مایع صفاقی، سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه و شستشو با PBS سرد جدا شدند [۲۲]. تعداد 10^5 ماکروفاژ در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه‌ایی حاوی محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد به همراه ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین کشت داده شد و در دمای ۳۷ °C با CO2 ۵% انکوبه شد. برای آلوده کردن ماکروفاژها تعداد 10^6 پروماستیگوت انگل در مرحله ایستایی به چاهک حاوی ماکروفاژ افزوده شد و در دمای ۳۷ °C و CO2 ۵ درصد انکوبه شد. ٦ ساعت بعد برای حذف ماکروفاژهای نچسبیده و پروماستیگوت وارد نشده به سلول، مایع

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 چسبنده است.

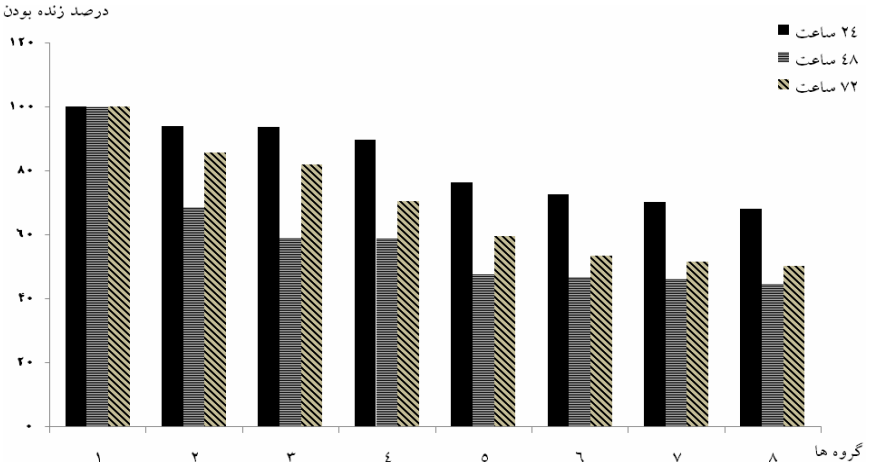
۲-۵. آنالیز داده‌ها

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

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کانتاریدین با غلظت ۰/۵ µg/mL پس از گذشت ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت در پروماستیگوت‌های لیشمانیا به‌ترتیب ۱۴/۲۶ درصد و ۳۱/۴۷، ۶/۲ درصد کشندگی داد، ولی غلظت ۵۰µg/mL پس از گذشت ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت به‌ترتیب ۴۹/۸۶ درصد و ۵۵/۵۴، ۳۲/۰۸ درصد کشندگی داد (نمودار شماره ۱ و جدول شماره ۱).

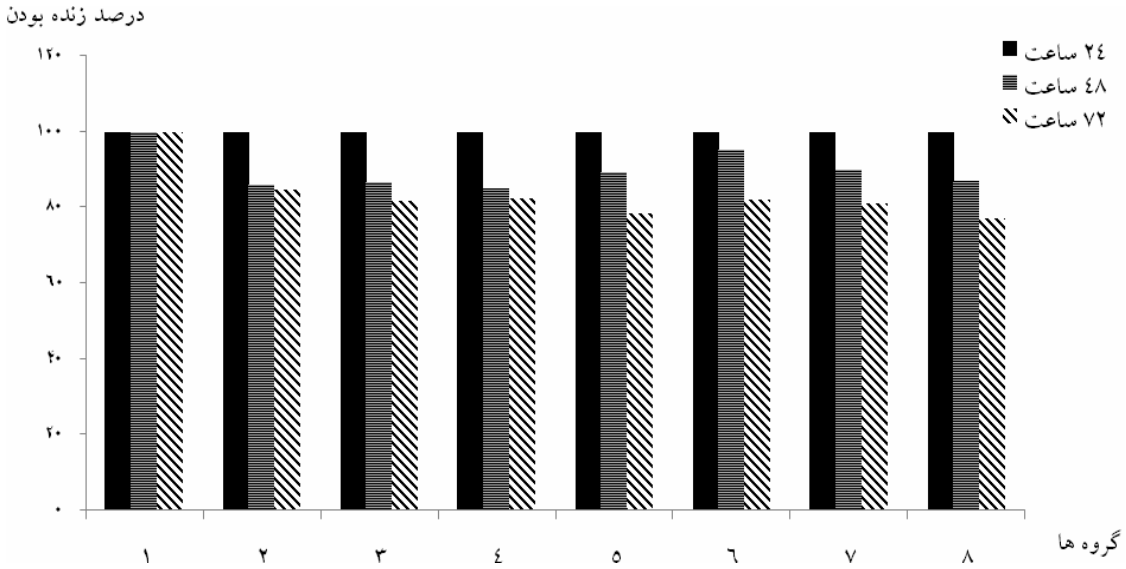
درصد کشندگی کانتاریدین با غلظت ۰/۵ µg/mL پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت در ماکروفاژهای غیرآلوده به‌ترتیب ۱۵/۲۳ درصد و ۱۳/۸۳، ۰ درصد بود. غلظت ۵۰µg/mL کانتاریدین در ماکروفاژهای غیرآلوده پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت به‌ترتیب ۲۲/۸۶ درصد و ۱۳/۰۱ درصد، ۰ درصد کشندگی داد (نمودار شماره ۲ و جدول شماره ۲). درصد کشندگی کانتاریدین با غلظت ۰/۵ µg/mL پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت در ماکروفاژهای آلود به لیشمانیا ماژور به‌ترتیب ۲/۳۳ درصد و ۵/۰۴، ۰ درصد بود. غلظت ۵۰ µg/mL کانتاریدین در ماکروفاژهای آلوده به انگل پس از ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت به‌ترتیب 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 ($P<0/05$). در گروه ماکروفاژ غیرآلوده پس از ۲۴ ساعت، کانتاریدین بر ماکروفاژها اثر معنی‌داری نداشت ($P>0/05$) ولی پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، کانتاریدین اثر معنی‌داری را بر سایر گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل داشت ($P<0/05$). پس از ۲۴ ساعت گروه کنترل (ماکروفاژ آلوده بدون کانتاریدین) تنها با گروه‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ (ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین ۵ µg/mL، ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین ۱۰ µg/mL، ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین ۲۰ µg/mL و ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین ۵۰ µg/mL) اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$). 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+کانتاریدین ۰/۵ µg/mL و ماکروفاژ آلوده+ کانتاریدین ۱ µg/mL) اختلاف معنی‌دار داشت ($P<0/05$).



نمودار شماره ۱- درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور پس از مواجه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت. ۱: گروه کنترل، ۲: لیشمانیا ماژور+کانتاریدین ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۳: لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۴: لیشمانیا ماژور+کانتاریدین۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۵: لیشمانیا ماژور+کانتاریدین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۶: لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۷: لیشمانیا ماژور+کانتاریدین ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۸: لیشمانیا ماژور+کانتاریدین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.

جدول شماره ۱- میانگین درصد زنده بودن پروماستیگوت‌ها پس از مواجه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت.

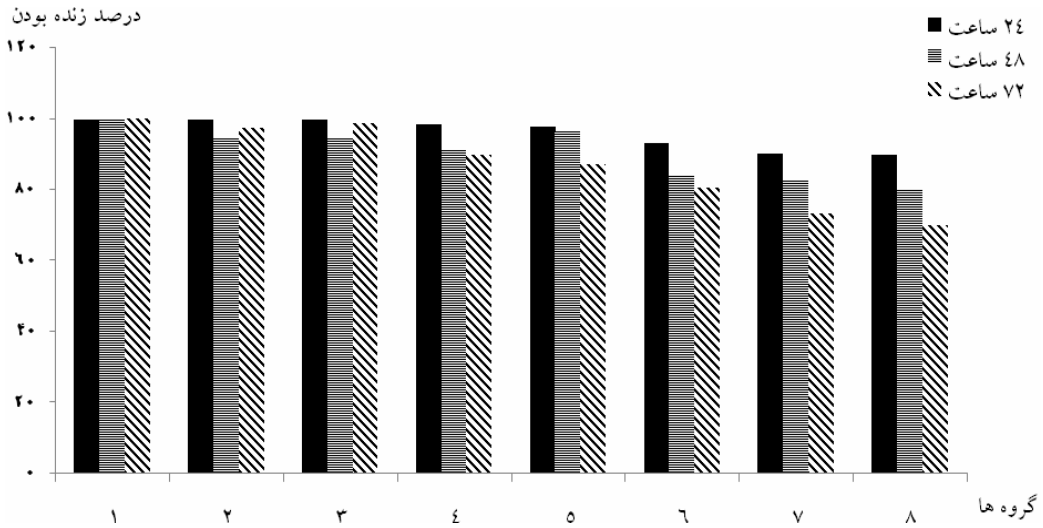
زمان (ساعت)	لیشمانیا ماژور بدون کانتاریدین (گروه کنترل)	لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۰/۵µg/mL	لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۱µg/mL	لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۲µg/mL	لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۵µg/mL	لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۱۰µg/mL	لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۲۰µg/mL	لیشمانیا ماژور+ کانتاریدین ۵۰µg/mL
۲٤	٪۱۰۰	٪۹۳/۸	٪۹۳/٦	٪۸۹/۵۱	٪۷٦/۱٦	٪۷۲/٤۲	٪۷۰/۲	٪٦۷/۹۲
٤۸	٪۱۰۰	٪٦۸/۵۳	٪۵۹/۰۱	٪۵۸/۷۸	٪٤۷/٤٤	٪٤٦/۷۲	٪٤٦/۱۱	٪٤٤/٤٦
۷۲	٪۱۰۰	٪۸۵/۷٤	٪۸۱/۸۸	٪۷۰/۳۱	٪۵۹/٤۲	٪۵۳/٤۵	٪۵۱/٤۷	٪۵۰/۱٤



نمودار شماره ۲- درصد زنده بودن ماکروفاژهای غیرآلوده پس از مواجه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۷۲ و ٤۸، ۲٤ ساعت. ۱: گروه کنترل، ۲: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۳: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، ٤: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۵: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ٦: ماکروفاژ غیر آلوده+کانتاریدین۱۰ 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 مواجه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۲٤ و ٤۸، ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	ماکروفاژ غیر آلوده بدون کانتاریدین (گروه کنترل)	ماکروفاژ غیر آلوده+ کانتاریدین ۰/۵µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ کانتاریدین ۱µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ کانتاریدین ۲µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ کانتاریدین ۵µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ کانتاریدین ۱۰µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ کانتاریدین ۲۰µg/mL	ماکروفاژ غیر آلوده+ کانتاریدین ۵۰µg/mL
۲٤	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
٤۸	٪۱۰۰	٪۸٦/۱۷	٪۸٦/۵۸	٪۸٤/۹۵	٪۸۹/٤۳	٪۹۵/۱۲	٪۸۹/۹۵	٪۸٦/۹۹
۷۲	٪۱۰۰	٪۸٤/۷۷	٪۸۱/٦۳	٪۸۲/٤٤	٪۷۸/۳٦	٪۸۲/۰٤	٪۸۱/۲۲	٪۷۷/۱٤



نمودار شماره ۳- درصد زنده بودن ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت لیشمانیا ماژور پس از مواجه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۷۲ و ۴۸، ۲۴ ساعت. ۱: گروه کنترل، ۲: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۰/۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر، ۳: ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، ٤: ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، ٥: ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین ۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر، ٦: ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۷: ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۸: ماکروفاژ آلوده+کانتاریدین ۵۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر.

جدول شماره ۳- میانگین درصد زنده بودن ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت لیشمانیا ماژور پس از مواجه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانتاریدین در زمان‌های ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	ماکروفاژ آلوده بدون کانتاریدین (گروه کنترل)	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۰/۵µg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۱µg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۲µg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵µg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۱۰µg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۲۰µg/mL	ماکروفاژ آلوده + کانتاریدین ۵۰µg/mL
۲٤	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۹۸/٦۵	٪۹۷/۸۹	٪۹۳/۰۸	٪۹۰/۳۵	٪۸۹/۹۲
٤٨	٪۱۰۰	٪۹٤/۹٦	٪۹٤/۷٦	٪۹۱/۲۷	٪۹٦/٤٤	٪۸٤/۲۷	٪۸۲/۷۵	٪۸۰/۰۵
۷۲	٪۱۰۰	٪۹۷/٦۷	٪۹۸/۷۳	٪۸۹/۹۷	٪۸۷/۳۵	٪۸۰/۸۱	٪۷۳/۲۷	٪۷۰/۰۳

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کانتاریدین با غلظت‌های مشخص شده، بیشترین اثر کشندگی را پس از ٤٨ ساعت بر پروماستیگوت‌ها داشت. بیشترین میزان کشندگی در پروماستیگوت های مواجه شده با کانتاریدین µg/mL ۵۰ پس از ٤٨ ساعت مشاهده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از میزان کشندگی کانتاریدین در پروماستیگوت‌ها کاسته شد. میزان IC_{50} پس از ۲٤ ساعت، µg/mL ۳/۵ محاسبه شد. در این تحقیق، کانتاریدین پس از ۲٤ ساعت بر ماکروفاژهای جدا شده از صفاق موش در شرایط برون‌تنی اثری نداشت. بیشترین میزان کشندگی (۲۲/۸٦ درصد) در گروه مواجه شده با کانتاریدین µg/mL ۵۰ پس از ۷۲ ساعت مشاهد شد. و این در حالی است که در مورد ماکروفاژهای آلوده به آماستیگوت انگل پس از ۲٤ ساعت کانتاریدین با غلظت بالاتر از µg/mL ۱ باعث کشندگی شد. بیشترین درصد کشندگی (۲۹/۹۷ درصد) در گروه مواجه شده با کانتاریدین µg/mL ۵۰ پس از ۷۲ ساعت مشاهد شد. در مطالعه غفاری فر [۲۱]، بیشترین میزان کشندگی در پروماستیگوت‌ها مربوط به غلظت µg/mL ۵۰ کانتاریدین پس از ۷۲ ساعت بود. هم‌چنین، میزان کشندگی پس از ۷۲ ساعت بیش از ٤٨ ساعت بود. در مطالعه مذکور تعیین درصد کشندگی با شمارش مستقیم به‌وسیله لام نئوبار انجام شده و میزان IC_{50} پس از ۲٤ ساعت µg/mL ۲ 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 ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت توسط تست MTT محاسبه شد. ولی در مطالعه غفاری‌فر 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 ٤٨ ساعت است و در مطالعه ذکر شده این میزان

در ۷۲ ساعت بیش از ٤٨ ساعت بود. در مطالعه ما پروماستیگوت-ها در فاز لگاریتمی قرار داشتند و با وجود کانتاریدین در محیط به رشد خود ادامه دادند، ولی در مطالعه ذکر شده سرعت رشد انگل پس از سه روز کاهش یافت و افزودن کانتاریدین 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 آپوپتوز 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 [۲٤،۲۳]. کانتاریدین باعث افزایش کاسپاز ۳ می‌شود و هم‌زمان باعث کاهش میزان پروتئین Bcl 2 به‌عنوان عامل مهارکننده آپوپتوز شده و در نتیجه باعث القای آپوپتوزیس می‌شود [۱۳،۱۲]. لیشمانیا فاقد سیستم کاسپاز است و آپوپتوز در آن از طریق ملکول‌های شبیه کاسپاز بنام متاکاسپاز صورت می‌گیرد. هنوز مکانیسم دقیق القای آپوپتوز در لیشمانیا به‌دنبال اثربخشی کانتاریدین مشخص نشده است. میلتفوسین در لیشمانیا دونوانی با کاهش نفوذپذیری غشای میتوکندری باعث افزایش رها شدن سیتوکروم c و در نهایت القای آپوپتوز می‌شود [۲۵].

نتیجه‌گیری

کانتاریدین 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.

تشکرو قدردانی

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

References:

[1] Simranjeet K, Hitesh P, Virag S, Prabha G, Nilanjan R. *Leishmani major* sructural 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://wwwentiastateedu/imagegal/coleoptera/blister/012135margblistbhtml2000.

[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 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, Bochzelt 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 norcantharididn 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.