مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ششم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۶، ۱۰۰-۹۱

ارزیابی تأثیر مشتقات جدید ۱ و ۳ و ٤ تیادی‌آزول بر تخریب لیشمانیا ماژور در روش آزمایشگاهی

سید جعفر نصرت‌آبادی[۱]، دکتر مجید فصیحی هرندی[۲]، دکتر علیرضا فرومدی[۳]، دکتر مجید محمودی[٤]، دکتر حمید دانشور[۲]

دریافت مقاله: ۸٤/۱۰/٤ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۵/۳/۱۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸٦/۷/۹ پذیرش مقاله: ۸٦/۷/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: درمان اساسی لیشمانیوز جلدی بیشتر بر اساس ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان هم‌چون گلوکانتیم و پنتوستام بوده است اما به دلایلی هم‌چون مقاومت دارویی و کم اثر شدن داروهایی که در حال حاضر به کار می‌روند به ترکیبات یا داروهای جدید نیاز مبرم می‌باشد. در این مطالعه تأثیر ضد انگلی مشتقات جدید ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول علیه انگل لیشمانیا ماژور به دو صورت تأثیر بر آماستیگوت‌ها و پروماستیگوت‌ها در محیط کشت در مقایسه با تارتارامتیک بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی پس از این که پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در محیط کشت به فاز ثابت رشد رسیدند آن‌ها را به نسبت ۵ به ۱، به ماکروفاژهای صفاق موش BALB/c اضافه نموده و سپس رقت‌های مختلف مشتقات جدید ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول و داروی کنترل (تارتارامتیک) را اضافه نمودیم و پس از ۵ روز میزان تأثیر با محاسبه PSI(Parasite survival index) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین جهت بررسی اثر این مشتقات بر فرم خارج سلولی انگل، از روشMTT استفاده گردیدکه میزان OD رنگ حاصله از احیاء MTT به فورمازان پس از ۷۲ ساعت خوانده شده و IC_{50} محاسبه گردید.

یافته‌ها: بعضی از این مشتقات در غلظت ۴/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأثیراتی بین ۶۷٪-۶٪ علیه فرم‌های داخل سلولی انگل داشته و در روش MTT تأثیرترکیبات بر فرم پروماستیگوتی انگل IC_{50} بین ۷/۶-۳/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از پژوهش نشان می‌دهد که دو ترکیب از مشتقات به کار رفته تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر لیشمانیا ماژور داشته است و به نظر می‌رسد که می‌توان از آن‌ها به عنوان ترکیبات جایگزین مناسب در مطالعات آینده استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول، تارتارامتیک

۱- (نویسنده مسؤول) مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان

تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۰۱۳۷۳، فاکس: ۰۳۴۱-۳۲۱۰۰۵۱، پست الکترونیکی: sjnosratabadi@yahoo.com

۲- استادیار گروه آموزشی انگل‌شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳- دانشیار گروه آموزشی تحقیقات علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- استادیار گروه آموزشی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سرطان تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

انگل لیشمانیا ماژور که باعث بیماری لیشمانیوز جلدی می‌گردد یک مشکل بهداشتی در اکثر کشورهای جهان به خصوص کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری هم‌چون ایران محسوب می‌شود [۱]. بیماری لیشمانیوز، یک بیماری تک یاخته‌ای منتقله از طریق حشرات است که در سراسر جهان گسترش داشته و ۹۰٪ موارد لیشمانیوز جلدی در ۷ کشور جهان شامل افغانستان، الجزایر، ایران، برزیل، پرو، سوریه و عربستان سعودی رخ می‌دهد. گزارشات سالانه بروز لیشمانیوز جلدی را ۱/۵-۱ میلیون مورد تخمین می‌زنند که جمعیت در معرض خطر بالغ بر ۳۵۰ میلیون نفر می‌باشند [۳-۲].

در درمان لیشمانیوز جلدی داروهای مختلفی از جمله ترکیبات سه و پنج ظرفیتی آنتیموان هم‌چون گلوکانتیم، پنتوستام، پنتامیدین و آمفوتریسین B به کار برده شده است [۴]. با توجه به وجود مسائلی از قبیل بروز تظاهرات جلدی متفاوت و پاسخ‌های متفاوت انگل به دارو [۵] و هم‌چنین ظهور مقاومت دارویی در مقابل املاح آنتیموان، لزوم بررسی و شناسایی داروهای جدید و مؤثر بر انگل لیشمانیا احساس می‌شود [۴،۶].

جهت بررسی حساسیت انگل نسبت به داروها و ترکیبات شیمیایی از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که در این مطالعه سعی شد علاوه بر کار بر روی پروماستیگوت‌ها، از سلول‌های ماکروفاژ صفاق موش نیز جهت ارزیابی رشد داخل سلولی انگل و تأثیر دارو استفاده شود تا شرایط ایجاد شده، الگویی از رشد انگل در داخل سلول میزبان باشد. از برتری‌های به کارگیری رده‌های سلولی یا ماکروفاژ به دلیل این که انگل می‌تواند فارغ از فاکتورهای میزبان تأثیر خود را بگذارد، سهولت رشد انگل و نتایج مناسب می‌باشد و از نتایج به کارگیری این روش‌ها است که ماکروفاژها به تنهایی و بدون اثر ترکیبات دیگر سیستم ایمنی، قادر به ممانعت از بقاء انگل هستند [۷]. جهت انجام کشت سلولی از رده‌های سلولی مختلفی هم‌چون THP-۱ (Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line)که یک رده سلولی انسانی است و یا ماکروفاژهای J۷۷۴ که سلول‌های ماکروفاژ موش Balb/c هستند و یا رده سلولی دیگر استفاده می‌شود [۱۲-۸] که در این تحقیق از ماکروفاژهای جدا شده از صفاق موش Balb/c یا (MPEM) Mouse peritoneal exudate macrophages استفاده شد.

ترکیبات آنتیموان که امروزه در درمان لیشمانیوز جلدی به کار می‌روند با اثر بر روی آنزیم‌های انگلی به خصوص وقفه آنزیم فسفوکیناز باعث جلوگیری از تولید آدنوزین تری‌فسفات می‌شوند [۱۳]. این ترکیبات خواص سمی داشته و فقط قابل تزریق می‌باشند. فرم‌های پنج ظرفیتی ترکیبات آنتیموان در محیط کشت چندان مؤثر نبوده [۱۱،۱۴] و در تحقیقات متعدد نشان داده شده است که فرم سه ظرفیتی ترکیبات آنتیموان علیه پروماستیگوت‌های گونه‌های مختلف لیشمانیا خاصیت سمی بیشتری نسبت به فرم پنج ظرفیتی دارد [۱۱،۱۵] و هم‌چنین نشان داده شده است پتاسیم آنتیموان تارتارات که فرم سه ظرفیتی آنتیموان است نسبت به پنتوستام علیه پروماستیگوت و آماستیگوت مؤثر بوده که بیانگر تبدیل فرم پنج ظرفیتی به فرم سه ظرفیتی در بدن می‌باشد [۱۶،۱۱] که با توجه به تأثیر فرم سه ظرفیتی آنتیموان (SbIII) بر فرم داخل سلولی و خارج سلولی انگل لیشمانیا ماژور، در این پژوهش به عنوان داروی کنترل استفاده شد [۱۰] و از مشتقات ۱ و ۳ و ۴ تیادی آزول به عنوان ترکیبات مورد تحقیق استفاده گردید. از این مشتقات در سنتز ترکیباتی با اثر متنوع استفاده می‌شود [۱۷] که به علت داشتن چربی‌دوستی بالا به راحتی قادر به عبور از غشاءهای زیستی می‌باشند و هم‌چنین اثر ضد آمیبی مشتقاتی از ایندول ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول به اثبات رسیده است [۱۸]. مطالعه حاضر به منظور بررسی حساسیت انگل لیشمانیا ماژور نسبت به مشتقاتی جدید از ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول [۲۰-۱۹] و

مقایسه تأثیر این مشتقات با فرم سه ظرفیتی آنتیموان (تارتارامتیک) در دو روش کشت سلولی و MTT **(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)** صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی می‌باشد که برای انجام آن مراحل زیر سپری شد.

تکثیر و آماده کردن انگل در محیط مایع RPMI-۱۶۴۰: پروماستیگوت‌های انگل *leishmania major* سوش MRHO/SU/۵۹/P (تهیه شده از دانشگاه گلاسکو، اسکاتلند) به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتر (Nunc-Denmark) حاوی محیط کشت مایع RPMI-۱۶۴۰ [(Roswell Park Memorial Institute) (Gibco BRL)] و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco BRL) که قبلاً کامپلمان آن غیر فعال شده و حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (CSL, Australia) بود، انتقال داده شد و در دمای ۲۵±۱°C نگهداری شد [۱۵، ۱۰].

دارو و مشتقات جدید تیوفن و ۱ و ۳ و ۴ تیادی آزول: دارویی که در این تحقیق از آن به عنوان داروی کنترل استفاده شده یک آنتیموان سه ظرفیتی بنام تارتارامتیک (Tartar emetic) است که به صورت پودر و به فرمول زیر می‌باشد .

Potassium antimony (III) oxide tartrate hemihydrate
$C_4H_4KO_7Sb \cdot 0/5H_2O$ >٪۹۹ (Merck-Germany)

و ترکیبات مورد تحقیق، مشتقاتی از تیوفن و ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول می‌باشند که از K۱ تا K۷ کدگذاری گردیدند. این ترکیبات توسط دکتر فرومدی و همکاران ایشان در آزمایشگاه شیمی دارویی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان سنتز گردیدند [۲۰-۱۹].

آماده کردن موش جهت جدا کردن ماکروفاژها: جهت تهیه ماکروفاژ در این تحقیق از موش‌های خالص نژاد Balb/c استفاده شد (موش‌ها از قسمت نگهداری حیوانات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه گردیدند). از طریق داخل صفاقی ۲ میلی‌لیتر محلول ۳٪ استریل تیوگلیکولات به موش‌ها تزریق شد و سه روز بعد مایع صفاقی جمع‌آوری گردید و با استفاده از رنگ تریپان بلو (Sigma) درصد زنده بودن ماکروفاژها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید [۲۱،۸].

$$\text{درصد زنده بودن ماکروفاژها} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{کل سلول‌های شمارش شده}} \times ۱۰۰$$

اضافه کردن ماکروفاژها به چمبراسلایدها: جهت انجام این مرحله از اسلایدهای ۸ خانه‌ای مخصوص (۱۵۴۵۳/K، Nunc-Denmark) استفاده شد. درب اسلاید را در شرایط استریل و زیر هود لامینار باز کرده و از سوسپانسیون سلولی تهیه شده از ماکروفاژهای صفاق موش که در هر میلی‌لیتر آن ۵×۱۰^{۵} ماکروفاژ بود ۳۵۰ میکرولیتر به چاهک‌های اسلاید اضافه گردید. به دو چاهک (خانه) در ستون اول به عنوان کنترل هیچ ترکیبی اضافه نشد و خانه‌های دیگر به صورت دو تایی جهت اضافه کردن رقت‌های مختلف داروی کنترل، مشتقات تیوفن و تیادی‌آزول در نظر گرفته شد و سپس اسلایدها به مدت یک شب (Over night) در انکوباتور با فضای مرطوب و دمای ۳۵ °c و تحت CO۲ ۵٪ قرار داده شد [۱۶،۷].

اضافه کردن پروماستیگوت‌ها به ماکروفاژهای اتصال یافته به سطح اسلایدها: پروماستیگوت‌های تکثیر یافته که در مرحله رشد ثابت خود بودند را با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم و رسوب حاصل که حاوی انگل‌ها بود را دو بار دیگر با PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل با pH=۷/۲ شسته و رسوب نهایی را با محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی به نحوی رقیق می‌کردیم که در هر میلی‌لیتر آن۲/۵ میلیون انگل وجود داشته باشد [۷].

قبل از اضافه کردن پروماستیگوت‌ها، محیط کشت داخل چاهک‌های چمبر اسلاید را خالی کرده و سپس ۳۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروماستیگوت‌هایی که در فاز ثابت رشد بودند به هر چاهک چمبر اسلاید که در مرحله قبل ماکروفاژها به صورت یک لایه به سطح آن‌ها اتصال یافته بودند در زیر هود اضافه گردید، به نحوی که نسبت پروماستیگوت به ماکروفاژ ۵ به ۱ شود [۸-۷].

پس از اضافه کردن پروماستیگوت‌ها، اسلایدها در انکوباتور با فضای مرطوب و دمای ۳۵ ^{o}C و ۵٪CO2 قرار داده شدند و پس از ۳ ساعت، سه بار با محیط RPMI-۱۶۴۰ شستشو داده شدند تا پروماستیگوت‌های اتصال نیافته حذف شوند. سپس اسلایدها به مدت یک شب در انکوباتور قرار داده شدند [۸-۷].

تهیه رقت‌های مختلف داروی کنترل و مشتقات ۱ و ۳ و ۴ تیادی آزول و اضافه کردن آن‌ها به اسلایدها: ابتدا از داروی کنترل (Sb III) و مشتقات مورد تحقیق به میزان ۵ میلی‌گرم وزن و به ترتیب در ۱میلی‌لیتر از PBS با pH=۷/۲ و DMSO (دی‌متیل سولفواکساید) حل گردید.

از مشتقات به کار رفته و داروی کنترل با تهیه رقت‌های متوالی (Serial Dilution) رقت‌هایی بین ۲۵۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ تهیه گردید و رقت‌های تهیه شده با گذراندن از فیلتر سر سرنگی (با منافذ ۰/۲ میکرون) استریل گردیدند.

اضافه کردن دارو: به میزان ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف داروی کنترل و مشتقات ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول که از قبل تهیه شده بود به صورت دوپلیکیت به چاهک‌های اسلاید اضافه گردید. بعد از افزودن ترکیبات به چاهک‌ها چند بار اسلاید را با حرکات چرخشی ملایم حرکت داده تا ترکیبات به طور یکسان در چاهک‌های اسلاید پخش شوند. به چاهک کنترل هیچ ترکیبی اضافه نگردید و سپس درب اسلایدها گذاشته و به مدت پنج روز دیگر در انکوباتور نگه‌داری شدند و محیط کشت داخل چاهک‌ها در روزهای دوم و پنجم با محیط کشت تازه تعویض شد [۱۰،۱۶]

شستشو و رنگ‌آمیزی: بعد از اتمام انکوباسیون، اسلایدها را از انکوباتور بیرون آورده و بعد از بیرون ریختن مایع روی سطح اسلاید آن‌ها را با قرار دادن در محیط آزمایشگاه خشک کردیم، سپس آن‌ها را با اتانول ۷۰ درجه فیکس کرده و توسط رنگ گیمسا به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی کردیم [۸].

طریقه بررسی میکروسکوپی اسلایدها: برای بررسی میکروسکوپی، هر قسمت مربعی را به ۵ قسمت تقسیم کرده – ۴ قسمت در گوشه‌ها و یک قسمت در وسط - و در هر قسمت ۱۰۰ سلول (ماکروفاژ) مورد بررسی قرار گرفت.

در بررسی فقط سلول‌های سالم شامل سلول‌های با محدوده مشخص، سیتوپلاسم آبی کم رنگ (خاکستری) و هسته قرمز ارغوانی در نظر گرفته شدند که در صورت آلوده به انگل بودن، آماستیگوت‌های بیضوی شکل از روی هسته و کینتوپلاست قابل شناسایی بودند.

در بررسی میکروسکوپی در هر میدان دید این سه حالت مورد توجه و شناسایی قرار گرفت:

الف: تعداد کل ماکروفاژهای آلوده و غیر آلوده به انگل

ب: تعداد ماکروفاژهای آلوده به انگل

ج: تعداد کل آماستیگوت‌های موجود در ماکروفاژهای آلوده به انگل

آزمون MTT: جهت ارزیابی اثرات داروی کنترل و مشتقات به کار رفته بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور از روش MTT استفاده شد.

روش MTT یک روش کمی اسپکتروفتومتری، در جهت اندازه‌گیری رشد و زنده بودن سلول‌ها با اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های زنده می‌باشد که ابتدا توسط Mosmann در سال ۱۹۸۳ ارایه شد [۲۲] و به صورت وسیعی برای تعیین میزان رشد سلول‌ها (زنده ماندن سلول‌ها) و آزمایش اثر داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۴-۲۳].

ابتدا به هر خانه از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور که در محیط RPMI-۱۶۴۰ بدون فنل رد کشت داده و در فاز ثابت رشد بودند به صورت دوپلیکیت اضافه گردید و سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های دارو و مشتقات مورد نظر را به هر خانه (well) اضافه کرده و پلیت را به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵±۱°c قرار دادیم. خانه اول پلیت به عنوان بلانک در نظر گرفته شد که حاوی فقط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون پروماستیگوت و یا دارو می‌باشد. بعد از زمان انکوباسیون به میزان ۱۰٪ حجم هر well از محلول ذخیره (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) MTT به هر well اضافه نمودیم. خانه کنترل منفی، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و فقط ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT می‌باشد. سپس پلیت‌ها را به مدت ۴-۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵±۱°c قرار دادیم [۱۱]. بعد از مدت زمان انکوباسیون، پلیت‌ها را بیرون آورده و کریستال‌های فورمازان را با افزودن حجمی معادل محیط کشت اولیه درخانه‌ها (۱۰۰ میکرولیتر در هر well) از ایزوپروپانل اسیدی شده (اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در ایزوپروپانل خالص) به چاهک‌ها حل نموده و جذب نوری (Optical Density) (OD) رنگ حاصله را در طول موج ۴۹۲ نانومتر با فیلتر مکمل ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری نمودیم [۲۵-۲۷].

روش‌های آماری: جهت آنالیز داده‌ها از نرم افزار Excel و جهت محاسبه مقادیر PSI و IC_{50} از رابطه‌های زیر استفاده گردید [۲۸-۲۹]:

$$\log(IC50)=\log(X1)+[(y1-y0.2)/(y1-y2)][\log(X2)-\log(X1)]$$

$$PSI=PI(A)100\ /PI(B)$$

که PI=Parasite index و A درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل در قسمت مورد آزمایش، B درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل در قسمت کنترل، y_1 مقدار انگل در غلظت x_1 (و همه غلظت‌های کمتر)، y_2 مقدار انگل در غلظت x_2 (و همه غلظت‌های بیشتر) و y_{0} مقدار انگل در قسمت کنترل می‌باشد.

نتایج

بررسی میکروسکوپی اسلایدهای حاوی رقت‌های مختلف داروی کنترل و مشتقات ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول: از بین رقت‌های به کار رفته داروی کنترل با توجه به مطالعات قبلی [۳۰] رقت‌های ۲/۳۴ و ۴/۶۹ و ۹/۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. غلظت بالاتر دارو به علت تأثیر سوء بر ماکروفاژها و یا پروماستیگوت‌ها - دژنره کردن آن‌ها – و غلظت پایین‌تر نیز به دلیل عدم تأثیر بر روی ماکروفاژها یا پروماستیگوت‌ها و در نتیجه عدم تفاوت آن‌ها با کنترل، مورد بررسی قرار نگرفتند.

پس از حل کردن مشتقات کد گذاری شده ازK۷-K۱ مشتقات K۱، K۲، K۴ و K۵ به علت عدم حلالیت مناسب و تشکیل رسوب و K۳ به علت این که پس از تأثیر بر ماکروفاژها باعث تخریب و دژنره شدن آن‌ها می‌شد از مطالعه خارج شدند و کار فقط بر روی K۶ و K۷ انجام شد.

با توجه به این که کار به صورت دوپلیکیت انجام شد، از تعداد ماکروفاژهای حاوی آماستیگوت‌ها و هم‌چنین تعداد آماستیگوت‌های درون ماکروفاژها در قسمت‌های شامل انگل و سلول که تحت تأثیر هیچ دارویی نبودند میانگین گرفته شد و به عنوان کنترل منظور گردید و با توجه به میانگین تعداد ماکروفاژهای حاوی آماستیگوت و هم‌چنین تعداد آماستیگوت‌های درون ماکروفاژها، در قسمت‌هایی که تحت تأثیر داروی کنترل و یا مشتقات به کار رفته بودند این نتایج حاصل شد (جدول ۱).

با توجه به نتایج جدول ۱ و با استفاده از رابطه تعیین IC_{50} در بررسی تأثیر فرم سه ظرفیتی آنتیموان بر فرم داخل سلولی انگل لیشمانیا ماژور، IC_{50} به میزان ۹/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و در قسمت‌های تحت اثر مشتق K۶، IC_{50} به میزان

۳/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و در قسمت‌های تحت اثر مشتق K۷، $IC_{۵۰}$ به میزان ۴/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

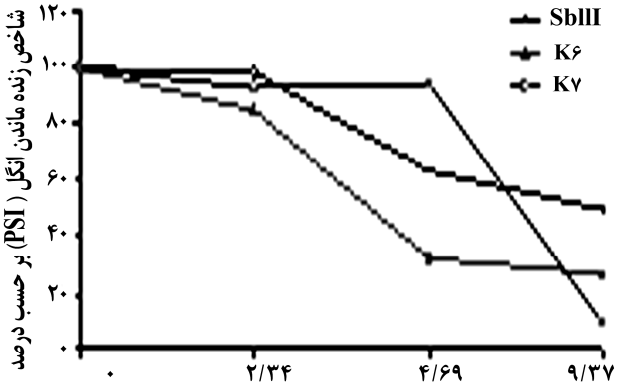
هم‌چنین در غلظت ۴/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر که غلظت نزدیک به مقدار $IC_{۵۰}$ در هر دو مشتق K۶ و K۷ می‌باشد PSI بین ۳۲/۵٪ و ۹۴/۱٪ به ترتیب جهت دو مشتق K۶ وK۷ به دست آمد (نمودار ۱) که نشان دهنده تأثیر بهتر K۶ نسبت به K۷ و SbIII می‌باشد.

در بررسی تأثیر ترکیبات بر فرم پروماستیگوتی در روش MTT، $IC_{۵۰}$ به میزان ۳/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۷/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب جهت دو مشتق K۶ و K۷ به دست آمد.

جدول ۱- مقایسه درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل و تعداد آماستیگوت‌های موجود در آن‌ها در غلظت‌های مختلف داروی کنترل و مشتقات جدید ۱ و ۳ و ٤ تیادی‌آزول

غلظت های مختلف دارو و مشتقات بکار رفته بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر								
	۰		۲/۳۴		۴/۶۹		۹/۳۷	
دارو و مشتقات بکاررفته	درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل	میانگین تعداد آماستیگوت‌های درون ماکروفاژها	درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل	میانگین تعداد آماستیگوت‌های درون ماکروفاژها	درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل	میانگین تعداد آماستیگوت‌های درون ماکروفاژها	درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل	میانگین تعداد آماستیگوت‌های درون ماکروفاژها
SbIII	۴۶/۱	۱۵۱/۵	۴۵/۲	۱۴۸	۲۹/۲	۱۲۹/۵	۲۲/۸	۷۴/۲
K۶	۴۶/۱	۱۵۱/۵	۳۹/۲	۸۷	۱۵	۲۲	۱۲/۴	۲۴/۲
K۷	۴۶/۱	۱۵۱/۵	۴۲/۸	۷۹	۴۳/۴	۷۱/۲	۴/۵	۴/۵

مقایسه جذب نوری به دست آمده در روش MTT جهت داروی کنترل و دو مشتق ۱ و ۳ و ۴ تیادی آزول بیانگر تأثیر بیشتر این دو مشتق نسبت به داروی کنترل می‌باشد (نمودار۲) به نحوی که K۷ در غلظت ۴/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به K۶، ۱/۵ برابر و نسبت به SbIII، ۱/۹ برابر تأثیر بیشتر در کاهش میزان جذب نوری داشته که نشانه تأثیر بهتر این ترکیب بر فرم پروماستیگوتی انگل نسبت به ترکیبات دیگر می‌باشد.



نمودار۱- مقایسه شاخص زنده ماندن (PSI) انگل‌های لیشمانیا ماژور در حالت استفاده از داروی کنترل و مشتقات ۱ و ۳ و ٤ تیادی آزول در روش کشت سلولی



نمودار۲- مقایسه جذب نوری داروی کنترل و مشتقات ۱ و ۳ و ٤ تیادی‌آزول جهت ارزیابی تأثیر ضد لیشمانیایی در طول موج ٤۹۲ نانومتر

تأثیر حلال (DMSO) در غلظت‌های مختلف ذکر شده جهت ترکیبات به کار رفته نیز با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت که بیانگر عدم تأثیر حلال بر انگل در این غلظت‌ها بود.

بحث

ظهور پدیده مقاومت دارویی در لیشمانیوزها و کاهش اثر داروهای رایج ضد لیشمانیایی [۳۱، ۱۲]، دستیابی به ترکیبات شیمیایی و داروهای جدید ضد لیشمانیایی را ضروری ساخته است، ترکیباتی که ضمن تأثیر مناسب اثرات سوء کمتری داشته باشند. در این تحقیق تأثیر مشتقاتی جدید از ۱ و ۳ و ۴ تیادی آزول بر تخریب لیشمانیا ماژور در روش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در مشتقات به کار رفته حلقه ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول به عنوان هسته اصلی در بروز تعدادی از اثرات فارماکولوژیکی شامل کاهش فشار خون، ضد تومور، ضد قارچ و ضد باکتری می‌باشد و به طور کلی ترکیبات حاوی استخلاف‌هایی در موقعیت ۲ و ۵ روی این حلقه، اثرات ضد باکتریایی و ضد تک یاخته‌ای قابل توجهی از خود نشان داده‌اند [۳۴-۱۹] و با توجه به تأثیر فرم سه ظرفیتی آنتیموان (SbIII) بر فرم داخل سلولی و خارج سلولی انگل لیشمانیا ماژور، از آن به عنوان یک داروی کنترل مناسب استفاده شد [۱۰]. هم‌چنین در مطالعه دیگری از این دارو به عنوان داروی کنترل روی ایزوله‌هایی از انگل لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا جمع‌آوری شده از شهر بم استفاده شد و اثر مناسب آن مشخص گردید [۳۰].

در این مطالعه در قسمت کشت سلولی از ماکروفاژهای صفاق موش Balb/c استفاده نمودیم و همانطور که در نتایج نیز اشاره شده است پس از تأثیر دو مشتق از مشتقات ۱ و ۳ و ۴ تیادی‌آزول و داروی کنترل که فرم سه ظرفیتی آنتیموان (SbIII) می‌باشد. IC_{50} و PSI محاسبه و با یکدیگر مقایسه گردید. با توجه به این که در رابطه‌های ذکر شده تعداد انگل‌ها و درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل در کلیه غلظت‌های به کار رفته مورد بررسی قرار گرفته است اطلاعات به دست آمده نشان دهنده اثر ضد لیشمانیایی دو مشتق مورد بحث در مقایسه با داروی کنترل می‌باشد، به نحوی که K۶ با IC_{50}. به میزان ۳/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به K۷ و SbIII تأثیر مناسب‌تری داشته است و هم‌چنین در مقایسه مقادیر PSI در غلظت ۴/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز K۶ نسبت به دو مورد دیگر بیشتر مانع از زنده ماندن انگل‌ها در درون ماکروفاژها شده که بیانگر تأثیر بهتر این مشتق می‌باشد.

نتایج به دست آمده از جذب نوری مشتقات به کار رفته و داروی کنترل در روش MTT نشان دهنده تأثیر K۷ در غلظت ۴/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد، به نحوی که به ترتیب نسبت به K۶ وSbIII، ۱/۵ و ۱/۹ برابر بیشتر تأثیر داشته است. اما تفاوت بین نتایج به دست آمده از میزان IC_{50}. در روش MTT با روش کشت سلولی از یک جهت می‌تواند مربوط به حضور و مشارکت ماکروفاژها در روش کشت سلولی باشد. به نحوی که در یک بررسی دیگر، همکاری و شرکت ماکروفاژها در تأثیر بیشتر داروها و مشتقات جدید ضد لیشمانیایی ثابت شده است [۷،۱۶] یعنی ماکروفاژها به عنوان یک مخزن برای آنتیموان عمل کرده و با تجمع دارو در خود باعث می‌شوند تا انگل بیشتر در معرض تماس با دارو قرار گیرد [۱۶]. اما در هر حال باید در نظر داشت که استفاده تنها از مدل‌های ماکروفاژ اندازه‌گیری دقیق پاسخ به دارو نمی‌باشد، چون نقش

سینرژیکی اینترفرون گاما و احتمالاً دیگر سیتوکاین‌ها در شیمی درمانی لیشمانیا در مطالعات دیگر نشان داده شده است [۷]. جهت ارزیابی اثرات مواد طبیعی و یا صناعی که مؤثر علیه لیشمانیا باشند از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود، که روش‌های کشت اگزنیک داخل سلولی آماستیگوت‌ها [۷،۱۰،۳۰] و هم‌چنین تأثیر این ترکیبات بر فرم خارج سلولی انگل لیشمانیا (روش MTT) از جمله این روش‌ها هستند [۳۰، ۱۰-۹]. این روش‌ها وسایل و ابزار مفیدی در فیلدهای فارماکولوژی و انگل‌شناسی می‌باشند که با استفاده از این روش‌ها می‌توان به ترکیبات جدید ضد لیشمانیایی با فعالیت اختصاصی بالا علیه انگل در مرحله داخل سلول‌های پستانداران دست یافت. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که آماستیگوت‌ها و پروماستیگوت‌ها در بسیاری از خصوصیات ساختمانی مشابه‌اند هر چند که آماستیگوت‌ها نسبت به پروماستیگوت‌ها دارای خواص متفاوت بیوشیمیایی هستند [۱۱] به طوری که تأثیر داروها در Invivo تحت اثر و کنترل پارامترهای مختلفی هم‌چون پارامترهای فارماکوکینتیک می‌باشد که یکی از مهم‌ترین این فاکتورها تأثیر مستقیم داروها علیه انگل در مرحله داخل سلول‌های بدن پستانداران یا همان مرحله آماستیگوتی می‌باشد که استفاده از روش‌های کشت آگزنیک آماستیگوت‌ها درون سلول‌های صفاق موش (MPEM) [۹] و یا استفاده از رده سلولی J774 [۱۱،۱۶] می‌تواند به عنوان راه‌های مناسب و قوی جهت ارزیابی، بررسی و جداسازی داروها، ترکیبات و یا مشتقات جدید و یا بررسی تأثیر مناسب علیه آماستیگوت‌های انگل لیشمانیا درون سلول‌های ماکروفاژ محسوب گردد [۱۱].

نتیجه‌گیری

با توجه به تأثیر نسبتاً خوب مشتقات مورد بررسی بر پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در مقایسه با تأثیر داروی کنترل، این تحقیق تلاشی در جهت دستیابی به ترکیبات مناسب می‌باشد که می‌توان با بررسی ترکیبات بیشتر و شناخت رابطه ساختمان و عمل، به ترکیبات جدید دست پیدا کرد و در مطالعات آینده از آن‌ها در Invivo به عنوان ترکیبات جایگزین مناسب استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان به واسطه تصویب و تقبل هزینه‌های این مطالعه و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و هم‌چنین از جناب آقای دکتر علی‌اکبر حق‌دوست به خاطر راهنمایی‌های ایشان در امور آماری تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

[1] World Health Organization. Control of the leishmaniases. World Health Organization Technical Report Series; 793. WHO, Geneva, Switzerland. 1990; P: 158.

[2] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004; 27(5): 305-318.

[3] World Health Organization. www.who.Int/ leishmaniasis/ burden/ magnitude/ burden-magnitude/en/index/html.

[4] Grogl M, Thomason TN, Franke E. Drug resistance in lieshmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*, 1992; 47(1): 117-26.

[5] Carrio J, Riera C, Gallego M, Ribera E, Portus M. In vitro susceptibility of Leishmania infantum to meglumine antimonate in isolates from repeated leishmaniasis episodes in HIV-coinfected patients. *J Antimicrob Chemoth*, 2001; 47(1): 120-1.

[6] Brendle JJ, Outlaw A, Kumar A, Boykin DW, Patrick DA, Tidwell RR, et al. Antileishmanial activity of several classes

[17] Vio L, Mamola M, Lneve A. Syntesis and antihypertensive activity of some 1, 3, 4-thiadiazole derivatives. *Farmaco*, 1988; 44(2): 165-72.

[18] Varvaresou A, Tsantili-Kakoulidou A, Siatra-Papastikoudi T,Tiligada E. Synthesis and biological evaluation of indole conyaining derivatives of thiosemicabazide and their cyclic 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole analoge. *Arzneimittel Forschung*, 2000; 50(1):48-54.

[۱۹] اصغریان رضایی م. سنتز مشتقات ۵، (۵- نیترو ۲ فنیل)- ۱ و ۳ و ۴ تیادی آزول به عنوان ترکیبات ضد لیشمانیایی. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان .شماره ۳۴ .سال تحصیلی ۸۱-۱۳۸۰،

[۲۰] پورنورمحمدی ش. سنتز مشتقات نیتروایمیدازول و نیتروفوریل تیادی آزول به عنوان ترکیبات ضد میکروبی. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان .شماره ۲۴۲ .سال تحصیلی ۷۸-۱۳۷۷،

[21] Romao PR, Fonseca SG, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ. Glutathione protects macrophages and Leishmania major against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology*. 1999; 118(Pt6): 559-66.

[22] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983; 65(1-2): 55-63.

[23] Mukkada AJ, Meade JC, Glaser TA, Bonventre PF. Enhanced metabolism of Leishmania donovani amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science*. 1985; 229(4718): 1099-101.

[24] Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barria E, et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for Leishmania. *J Microbiol Methods*, 2003; 55(3):813-6.

[25] Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen TC. The use of a water- soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of Leishmania major promastigote. *Parasitol Res*, 1994; 80(3): 235-9.

[26] Formarola l, Spinelli R, Brandonisio O. Invitro assay for avaluation of drug activity against leishmania Spp. *Res Microbiol*, 2004; 155: 224-30.

of aromatic dications. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(3): 797-807.

[7] Ibrahim ME, Hag-Ali M, el-Hassan AM, Theander TG, Kharazmi A. Leishmania resistant to sodium stibogluconate: drug-associated macrophage – dependent killing. *Parasitol Res*, 1994; 80(7): 569-74.

[8] Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D. An invitro model for screening antilishmanial drugs: the human leukemia monocyte cell line THP-1. *Acta Trop*, 1992; 51(3-4): 237-45.

[9] Sereno D, Lemesre JL. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of Leishmania amazonensis invitro. *Parasitol Res*, 1997; 83(4): 401-3.

[10] Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaissi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of Leishmania infantum used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents and Chemother*, 1998; 42(12): 3097-102.

[11] Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997; 41(5): 972-6.

[12] Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmuller P, Ouaissi A, et al. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotyp during the in vitro life cycle of Leishmania infantum: implications for the spread of chemoresistance in endemic area. *Acta Trop*, 2001; 80(3):195-205.

[13] Martindale. The complete drug reference. 33rd ed. London. Pharmaceutical press. 2002; P: 582.

[14] Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mecanism of the antilieshmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents and Chemother*, 1985; 27(6): 916-20.

[15] Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fraction. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37(9): 1842-6.

[16] Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri-and pentavalet antimonial preparations. *Antimicrobial Agents Chemoth*, 1995; 39(6): 1234-9.

[27] Sacks DL, Parkins PV. Identification of an infective stage of Leishmania promastigote. *Science*. 1984; 223 (4643): 1417-9.

[28] EL-ON J, Messer G. Leishmania major Antileishmanial activity of methylbenzethonium chloride. *Am J Trop Med Heg*, 1986; 35(6):1110-6.

[29] Huber W, Koella JC. A comparison of three method of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Trop*, 1993; 55(4): 257-61.

[۳۰] محمودی م، نصرت‌آبادی س‌ج، فکری ع ر، حق پرست ع، شریفی ا . بررسی چگونگی مقاومت در درمان لیشمانیوز جلدی به مگلومین آنتیموان(گلوکانتیم): مقایسه حساسیت انگل جدا شده از بیمار به دارو در محیط کشت به پاسخ کلینیکی بیمار به درمان. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان. بهار و تابستان۱۳۸۲، جلد ۴، شماره ۳ و ۴، صفحات: ۱۵۰-۱۴۳.

[31] Fidalgo LM, Alvarez MM, Gerigle LF, Pineiro RP, Navarro MS, Cabrera HR. Effect of thiadiazine derivatives on intracellular amastigotes of *leishmania amazonensis*. *Mem Ins Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 2004; 99(3): 329-30.

[32] Foroumadi A, Soltani F. Antituberculosis agent I. syntesis and antituberculosis activity of 2-aryl-1, 3, 4-thiadiazole derivatives. *Pharmazie*, 2001; 56 (8): 610-2.

[33] Foroumadi A, Emami S, Hassanzadeh A. Synthesis and invitro antifungal activity of 2-aryl-5-phenylsulfonyl-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Arzneimittel forschung*, 1999; 49(12):1035-8.

[34] Foroumadi A, Soltani F, Moallemzadeh-Haghighi H, Shafiee A. Synthesis, invitro –antimycobacterial activity and cytotoxicity of some alkyl alph-(5-aryl-1, 3, 4-thiadiazole-2-ylthio)acetates. *Arch Parm (Weinheim)*, 2005; 338(2-3): 112-6.