اثرات سایتوتوکسیک داروی ۵-فلورواوراسیل بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور و القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی

مهدی دلاوری[۱]، عبدالحسین دلیمی[۱*]، فاطمه غفاری فر[۱]، جاوید صدرایی[۱]

۱) گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۶

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز جلدی یکی از مشکلات بهداشت عمومی در ایران به شمار می آید. ترکیبات آنتیموان داروهای معمول در درمان این بیماری هستند. اما مصرف این داروها دارای محدودیت ها و عوارض سوء متعددی است و خطر عود بیماری نیز وجود دارد به طوری که تحقیقات برای معرفی داروهای جدید و موثر از اهمیت بالایی برخوردار است. در پژوهش حاضر، تاثیر داروی ۵-فلورواوراسیل بررسی شد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط In vitro مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین تاثیر این دارو در روند القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در پروماستیگوت های انگل بررسی شد.

مواد و روش ها: غلظت های مختلف از داروی ۵-فلورواوراسیل(۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در سه زمان(۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر پروماستیگوت های انگل تاثیر داده شده و با استفاده از شمارش تعداد انگل IC50 (half maximal inhibitory concentration) محاسبه شد. با استفاده از آزمونMTT -3-(4, 5- dimethyl thiazolyl-2)-2, 5-diphenyle tetrazolium bromide] درصد زنده بودن انگل پس از اضافه کردن دارو تعیین شد و به منظور بررسی القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در انگل آنالیز فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفت.

یافته های پژوهش: ۲۴ ساعت پس از کشت تعداد انگل در گروه کنترل $۱/۲۵\times۱۰^{۶}$ در هر میلی لیتر شمارش شد و این تعداد در غلظت ۱۲ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از دارو به ترتیب $۰/۷۳\times۱۰^{۶}$ و $۰/۴\times۱۰^{۶}$ شمارش شد. IC50 دارو ۲۴ ساعت پس از کشت ۲۶/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. آنالیز نتایج به دست آمده از آزمون فلوسایتومتری نشان داد که داروی ۵-فلورواوراسیل باعث القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در پروماستیگوت های انگل می شود که در گروه کنترل ۷۲ ساعت پس از کشت انگل میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی ۳/۶۴ درصد بود در حالی که پس از این مدت زمان در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی ۷۴/۵ درصد تعیین شد.

بحث و نتیجه گیری: طبق نتایج حاصله، داروی ۵-فلورواوراسیل دارای اثرات ضد لیشمانیایی بوده و می توان آن را برای مطالعه در شرایط درون تنی به عنوان دارویی جدید علیه انگل لیشمانیا پیشنهاد داد.

واژه های کلیدی: لیشمانیا ماژور، ۵-فلورواوراسیل، مرگ برنامه ریزی شده سلولی، فلوسایتومتری

* **نویسنده مسئول:** گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

Email: dalimi_a@modares.ac.ir

مقدمه

لیشمانیازیس بیماری منتقله از پشه است که انسان از طریق نیش پشه خاکی آلوده به آن مبتلا می شود. شکل بالینی بیماری از زخم های جلدی مزمن و آسیب های پوستی و مخاطی شدید تا درگیری اندام های داخلی متغیر است. لیشمانیازیس جلدی در ۹۸ کشور و ۵ قاره به صورت اندمیک وجود دارد،(۳-۱)، و سالانه ۱/۵ میلیون مورد جدید از این بیماری در جهان گزارش می شود،(۴،۵). بر اساس انتشار جغرافیائی، لیشمانیازیس جلدی به دو گروه دنیای قدیم و جدید تقسیم بندی می شود و عامل آن در بیشتر مناطق دنیای قدیم L.major است. علائم بالینی به شکل ندولی کوچک است که از چند هفته تا چند ماه پس از آلوده شدن شخص سر باز می کند و ایجاد زخمی مشخص در پوست می نماید،(۸-۶). داروهای شیمیایی مختلفی از جمله میلتفوسین، پارومومایسین، آمفوتریسین ب، لیپوزومال آمفوتریسین ب، آلوپورینول و مپاکرین در درمان این بیماری مورد استفاده قرار می گیرند،(۹). خط اولیه درمان این بیماری استفاده از ترکیبات آنتی موآن می باشد، ولی این ترکیبات دارای عوارض جانبی بوده و مقاومت دارویی و نیز عود بیماری پس از درمان وجود دارد،(۱۰،۱۱). زخم سالک چندان مشکل آفرین نبوده و اغلب ضایعات آن خود به خود بهبود می یابند، ولی به دلائل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم، بد شکل بودن جوشگاه باقی مانده و احتمال عفونت های ثانویه در محل ضایعه ارائه روش درمانی آسان، قابل تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به نظر می رسد،(۱۲،۱۳). فلورواوراسیل در گروه داروهای آنتی متابولیت قرار می گیرد، دارویی است که از چهل سال پیش در درمان سرطان های مختلف به خصوص سرطان های گوارشی مورد استفاده قرار گرفته است،(۱۴). هم چنین در درمان سرطان های پوستی(به صورت موضعی) و برخی اقدامات چشم پزشکی مانند ترابکولکتومی در درمان گلوکوم نیز به کار می رود. این دارو از طریق ممانعت از عملکرد تیمیدیلات سنتتاز عمل می کند، ممانعت از فعالیت این آنزیم از ساخته شدن تیمیدین که در فرایند همانند سازی DNA مورد نیاز است جلوگیری می کند،(۱۶-۱۴). این دارو در واقع یک آنالوگ پیریمیدین است که از طریق ممانعت از سنتز DNA باعث توقف چرخه سلولی و نیز القاء مرگ برنامه ریزی شده در سلول می شود هم چنین فلورواوراسیل در فاز S چرخه سلولی اختلال ایجاد کرده و تقسیم سلولی را متوقف می کند،(۱۶،۱۷). در حال حاضر دو شکل مصرفی از این دارو مورد استفاده قرار می گیرند که یک شکل به صورت پماد موضعی و دیگری به صورت ویال تزریقی است. شکل موضعی آن در درمان بسیاری از آسیب های پوستی مصرف می شود، از جمله در درمان کراتوزیز خورشیدی، کارسینومای سلول های سنگفرشی، پسوریازیس، زگیل های ویروسی، زگیل های تناسلی، پروکراتوزیز سطحی و پروکراتوزیز خطی مورد استفاده قرار می گیرد،(۱۹-۱۷). شکل تزریقی آن در درمان سرطان های مختلف از قبیل سرطان های گوارشی مانند سرطان کولورکتال و سرطان پانکراس و نیز آدنو کارسینومای تخمدان و سینه کاربرد دارد،(۲۲-۲۰). تا به امروز تحقیق جامعی در زمینه اثربخشی این دارو بر روی لیشمانیا صورت نگرفته است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات سایتوتوکسیک و نیز القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی داروی ۵-فلورواوراسیل بر انگل لیشمانیا بود.

مواد و روش ها

لیشمانیا ماژورسویه MRHO/IR/75/ER از موسسه تحقیقاتی رازی تهیه شد.

تعیین میزان IC50 دارو

۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI1640 و سرم جنین گاوی۱۰ درصد حاوی پروماستیگوت(با تعداد ۱×۱۰^{۶} انگل در هر میلی لیتر) به هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه ای مخصوص کشت سلول اضافه شد و در ادامه به هر چاهک داروی ۵-فلورواوراسیل در غلظت های ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزوده شد. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن دارو تعداد انگل شمارش شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش ها سه بار تکرار شد. هم چنین در هر پلیت سه تا از چاهک ها فقط دارای پروماستیگوت و محیط بوده و فاقد داروی ۵-فلورواوراسیل بود که این چاهک به عنوان کنترل آزمون در نظر گرفته شد. IC50 داروی ۵-فلورواوراسیل پس از ۲۴ ساعت با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 5 محاسبه شد.

تعیین درصد کشندگی به وسیله آزمایش MTT

۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI1640 و سرم جنین گاوی۱۰ درصد حاوی پروماستیگوت(با تعداد ۱×۱۰^{۶} انگل در هر میلی لیتر) به هر چاهک در پلیت های ۹۶ خانه ای مخصوص کشت سلول اضافه شد. در سه چاهک مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI1640+۱۰ درصد سرم جنین گاوی حاوی انگل ریخته شده و به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. ۲۴، ۴۸ و ساعت پس از اضافه کردن داروی ۵-فلورواوراسیل(۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر

میلی لیتر) به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول [3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide] MTT(با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد و پس از انجام مراحل پایانی، جذب نوری چاهک ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدرخواند شد و نتایج آزمایش به صورت OD محاسبه گردید. درصد زنده بودن سلول از طریق فرمول زیر محاسبه شد. AB جذب نوری چاهک بلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با دارو است.

درصد زنده بودن انگل=[AT-AB]/[AC-AB]×100

بررسی القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در پروماستیگوت های انگل پس از افزودن داروی ۵- فلورواوراسیل

در این آزمون از کیت Annexin-V (Biovision) FLUOS Staining استفاده شد. انگل های مواجه شده با غلظت های مختلف داروی ۵- فلورواوراسیل(۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) جمع آوری شده و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه(به مدت ۵ دقیقه) سانتریفوژ شده و با محلول خنک بافر فسفات شسته شدند. مطابق دستورالعمل کیت به سلول های ته نشین شده ۵ میکرولیتر از محلول Annexin-V و نیز میکرولیتر از محلول PI اضافه شد و سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد و شدت رنگ جذب شده توسط سلول ها با استفاده از دستگاه BD FACSCanto II خوانده شد و در نهایت نتایج توسط نرم افزار FlowJo آنالیز شد. لازم به ذکر است نمونه های کشت داده شده با داروی فلورواوراسیل پس از ساعت های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ برای آزمایش های فلوسایتومتری جمع آوری شدند.

برای آنالیز و مقایسه نتایج ابتدا آزمون نرمالیته کولموگروف اسمیرنوف انجام شد و سپس از آزمون t-test برای مقایسه نتایج گروه های تست با گروه کنترل استفاده شد.

یافته های پژوهش

پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل در حضور داروی ۵- فلورواوراسیل، تعداد انگل با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. ۲۴ ساعت پس از کشت تعداد انگل در گروه کنترل $۱/۲۵\times۱۰^{۶}$ در هر میلی لیتر از محیط کشت بود که این تعداد در غلظت ۱۲ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از دارو به ترتیب $۰/۷۳\times۱۰^{۶}$ و $۰/۰۴\times۱۰^{۶}$ شمارش شد و با استفاده از نتایج شمارش انگل IC50 دارو ۲۴ ساعت پس از کشت ۲۶/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد، هم چنین تعداد انگل ۷۲ ساعت پس از کشت در گروه کنترل و غلظت های ۱۲، ۲۴، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب $۱/۵\times۱۰^{۶}$، $۰/۶۶\times۱۰^{۶}$، $۰/۵۷\times۱۰^{۶}$، $۰/۴۴\times۱۰^{۶}$ و $۰/۳۴\times۱۰^{۶}$ شمارش شد.(جدول شماره ۱)

جدول شماره ۱. میانگین و انحراف معیار تعداد پروماستیگوت ها در آزمون ممانعت از رشد انگل (نتایج میانگین سه بار تکرار است)

۵- فلورواوراسیل (میکروگرم بر میلی لیتر)	تعداد پروماستیگوت ها(×۱۰۶)		
	۲۴ ساعت	۴۸ساعت	۷۲ساعت
۱۲	۰/۷۳±۰/۰۲	۰/۷۱ ±۰/۰۱	۰/۶۶±۰/۰۲
۲۵	۰/۶۳ ±۰/۰۳	۰/۵۸±۰/۰۲	۰/۵۷±۰/۰۳
۵۰	۰/۵±۰/۰۱	۰/۴۷±۰/۰۴	۰/۴۴±۰/۰۴
۱۰۰	۰/۴±۰/۰۱	۰/۳۷±۰/۰۳	۰/۳۴±۰/۰۲
کنترل	۱/۲۵±۰/۱	۱/۳۷±۰/۱	۱/۵±۰/۰۵
اختلاف بین گروه های تست با گروه کنترل معنی دار است(**P<0.05**)			

نتایج آزمون MTT

درصد زنده ماندن پروماستیگوت ها پس از افزودن غلظت های مختلف داروی ۵-فلورواوراسیل در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت با استفاده از آزمون MTT محاسبه شد. نتایج در جدول شماره ۲ آمده است. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت در بالاترین غلظت(۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به ترتیب ۳۱/۸، ۲۶/۲ و ۲۰/۲ درصد از سلول ها زنده بودند.(جدول شماره ۲)

جدول شماره ۲. درصد زنده ماندن پروماستیگوت های انگلپس از مواجه با دارو

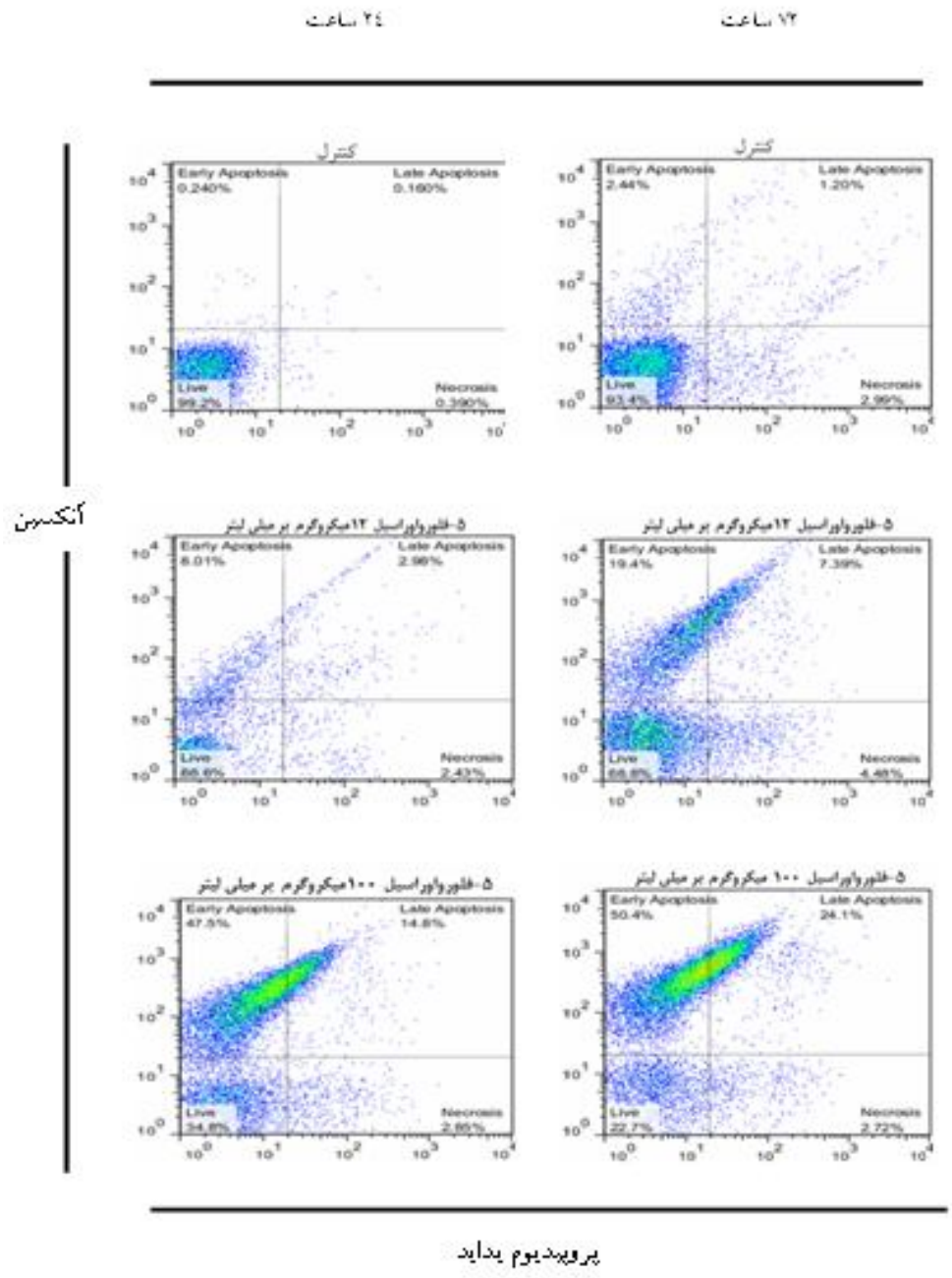
۵-فلورواوراسیل (میکروگرم بر میلی لیتر)	درصد زنده ماندن انگل		
	۲۴ساعت	۴۸ساعت	۷۲ ساعت
۱۲	۶۰	۵۵	۵۱/۵
۲۵	۵۱	۴۲/۴	۳۷/۶
۵۰	۳۶/۶	۳۲	۳۰/۹
۱۰۰	۳۱/۸	۲۶/۲	۲۰/۲

نتایج القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

با استفاده از کیت Annexin-V درصد سلول های دچار مرگ برنامه ریزی شده سلولی اولیه(آنکسین مثبت)، سلول های دچار مرگ برنامه ریزی شده سلولی تاخیری(آنکسین وپروپیدیوم یداید مثبت)، سلول های دچار نکروز شده(پروپیدیوم یداید مثبت) و سلول های زنده(آنکسین وپروپیدیوم یداید منفی) در چهار غلظت ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر داروی ۵-فلورواوراسیل و در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت مشخص شد. ۲۴ ساعت پس از کشت در غلظت های مذکور و در گروه کنترل درصد سلول های دچار مرگ برنامه ریزی شده سلولی به ترتیب ۱۰/۹۹، ۳۱/۸۳، ۵۰/۹، ۶۲/۳ و ۰/۴ درصد بود.(جدول شماره ۳) هم چنین ۷۲ ساعت پس از کشت کمترین(۲۶/۷۹ درصد) و بیشترین(۷۴/۵ درصد) میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی به ترتیب در غلظت های ۲۴ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رخ داد.(شکل شماره ۱)

جدول شماره ۳. درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سه زمان ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از کشت و افزودن غلظت های مختلف داروی ۵-فلورواوراسیل

۵- فلورواوراسیل (میکروگرم بر میلی لیتر)	درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی		
	۲۴ساعت	۴۸ساعت	۷۲ ساعت
۱۲	۱۰/۹۹	۱۴/۳۹	۲۶/۷۹
۲۵	۳۱/۸۳	۳۴/۱۶	۳۹/۸
۵۰	۵۰/۹	۵۰/۴	۵۷/۳
۱۰۰	۶۲/۳	۷۱/۴	۷۴/۵
کنترل	۰/۴	۰/۴۱	۳/۶۴



شکل شماره ۱. نتایج فلوسایتومتری در لیشمانیا ماژور پس از افزودن غلظت های ۱۲ و ۱۰۰ میکروگرم از ۵-فلوراوراسیل در ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از کشت. با افزایش زمان و غلظت آلوئه امودین القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی(اولیه و تاخیری) در پروماستیگوهای انگل افزایش یافت. در تصویر درصد سلول های زنده، مرگ برنامه ریزی شده سلولی اولیه، مرگ برنامه ریزی شده سلولی تاخیری و نکروز در چهار منطقه مجزا نشان داده شده است.

بحث و نتیجه گیری

مقاومت های داروئی و عوارض سوء داروهای معمول در درمان لیشمانیازیس به همراه عود بیماری در بیماران بهبود یافته همواره باعث افزایش تمایل برای انجام مطالعات دارویی در جهت دستیابی به دارویی موثر و مناسب در درمان بیماری است،(۱۰،۱۱). در این تحقیق داروی ۵-

فلورواوراسیل با توجه به این که در درمان برخی عوارض پوستی کاربرد دارد و قابلیت آن در القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول های مختلف ثابت شده است،(۲۴-۱۶)، جهت بررسی اثرات ضد لیشمانیایی آن مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که داروی ۵-فلورواوراسیل دارای اثر ممانعت کنندگی بر رشد پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور است که میزان تاثیر دارو وابسته به دوز دارو و زمان اثربخشی آن است به نحوی که با افزایش دوز دارو و زمان اثربخشی میزان رشد انگل کاهش می یابد. درصد زنده ماندن انگل نیز وابسته به دوز دارو و زمان بود، با افزایش غلظت دارو میزان زنده ماندن پروماستیگوت ها کاهش یافت و کمترین مقدار آن در دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۷۲ ساعت پس از کشت مشاهده شد. آنالیز نتایج به دست آمده از آزمون فلوسایتومتری نشان داد که در هر غلظت استفاده شده از ۵-فلورواوراسیل با افزایش زمان میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی افزایش می یابد. آنکسین رنگی است که به فسفاتیدیل سرین متصل می شود، در سلول زنده این فسفولیپید در سطح داخلی غشاء سلول قرار دارد ولی در شرایط مرگ برنامه ریزی شده این ترکیب به سطح خارجی غشاء می آید بنا بر این آنکسین در سلول های در حال مرگ برنامه ریزی شده مثبت می شود در حالی که پروپیدیوم یداید به DNA سلول متصل می شود و چون نمی تواند از غشاء سلول نفوذ کند تنها در سلول های تخریب شده به DNA متصل می شود. در این تحقیق نیز با گذشت زمان درصد سلول هایی که اتصال آن ها به هر دو رنگ آنکسین و پروپیدیوم یداید مثبت بود افزایش یافت که این امر نشان دهنده روند تاثیرگذاری ۵-فلورواوراسیل بر ساختمان سلولی انگل است. ۵-فلورواوراسیل از طریق تغییرات اکسیداتیو داخل سلولی باعث القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در کاردیوسیت های رت می شود،(۲۳). مطالعات انجام شده نشان می دهد که ۵-فلورواوراسیل در سلول های سرطانی کلون از طریق ایجاد تغییرات در پروتئین های خانواده Bcl-2 مرگ برنامه ریزی شده سلولی را القاء می کند،(۲۴). هم چنین این دارو از طریق فعال کردن کاسپاز ۸ و ۳ باعث رخداد مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول های آدنوکارسینومای کلورکتال می شود،(۲۵). در مطالعات گذشته القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در لیشمانیا با استفاده از داروی میلتفوسین بررسی شده است،(۲۶). هم چنین القاء این فرایند سلولی توسط گیاه Allium sativum بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور با استفاده از فلوسایتومتری اثبات شده است،(۲۷). مطالعات مختلف نشان می دهد که ترکیبات و داروهای دیگری نیز از قبیل کانتاریدین، آرتمتر و آرتمیزین باعث القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در انگل لیشمانیا می شوند،(۳۰،۲۹،۲۸). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که داروی ۵-فلورواوراسیل باعث رخداد مرگ برنامه ریزی شده سلولی در پروماستیگوت های انگل لیشمانیا می شود اما مکانیسم، مسیرها و پروتئین های موثر در القاء این فرایند سلولی در انگل مشخص نیست ما نیز در مطالعه انجام شده تنها به رخداد یا عدم رخداد این فرایند در پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور پرداختیم از این رو انجام مطالعات بیشتر در شناسایی مکانیزم دقیق اثربخشی این دارو مورد توجه است. با توجه به نتایج این تحقیق انجام مطالعات درون تنی می تواند در دستیابی و معرفی دارو و یا ترکیب دارویی مناسب در درمان لیشمانیازیس جلدی مفید واقع شود.

سپاسگزاری

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- Ben-Salah A, Ben MN, Guedri E, Z-aatour A, Ben AN, Bettaieb J, et al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous Leishm-aniasis. N Engl J Med 2013; 6: 524-32.
2- Makwali J.A, Wanjala FME, Kaburi JC, Ingonga J, Byrum WW, Anjili CO. Combination and monotherapy of Leis-hmania major infection in BALB/c mice using plant extracts and herbic-ides. J Vector Borne Dis 2012; 49: 123-30.
3- Garnier T, Croft SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Investig Drugs 2002; 3:123-8.
4- Simranjeet K, Hitesh P, Virag S, Pra-bha G, Nilanjan R. Leishmania major structural database. IJIB 2009; 7:63-8.
5- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol 2000; 25: 363-70.
6- Sacks D, Perkins P. Identification of an infective stage of Leishmania prom-astigote. Science 1985; 233: 1412-7.
7- Alexander J, Russell D. The interaction of Leishmania species with macroph-hages. Adv Parasitol 1992; 31:175-254.
8- Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spect-rum of leishmaniasis.Clin Infect Dis 1996;22: 1-13.
9- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leish-maniasis .Indian J Med Res 2006 ;123: 399-410.
10- Pujals G, Sune-Negre J, Perez P, Ga-rcia E, Portus M, Tico J, et al. In vitro evaluation of the effectiveness and cyt-otoxicity of meglumineantimoniate mi-crospheres produced by spray drying against Leishmania infantum. Parasitol Res 2008; 102: 1243-7.
11- Herwaldt BL, Berman JD. Recomme-dations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg 1992; 46: 296-306.
12- Berman JD. Human leishmaniasis: cli-nical Diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997; 24: 684-703.
13- Brodskyn C, De Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishma-niasis: advances in the last five years. Expert Rev Vaccines 2003; 2: 705-717.
14- Erada M, ZhiI Y, Shirley L. Tumor tre-atment by sustained intratumoral rele-ase of 5-fluorouracil: effect of drug al-one and in combined treatments. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002; 54:1550-7.
15- Shirley HL, Chiun-Hou H.needling rev-ision with subconjunctival 5-fluorou-racil in failing filtering blebs. Chang Gung Med J 2002; 25:97-103.
16- De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL, Stokke T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. Mol Cancer 2006; 18:5:20.
17- Kirby JS, Miller CJ. Intralesional che-m.otherapy for nonmelanoma skin ca-ncer: A practical review. J Am Acad Dermatol 2010; 63:689-702.
18- Weinberg JM. Topical therapy for Act-inic Keratoses: Current and evolving therapies. Rev Recent Clin Trials 2006; 1:53-60.
19- McGillis ST, Fein H. Topical treatment strategies for non-melanoma skin canc-er and precursor lesions. Semin Cutan Med Surg 2003; 23:174-83.
20- Choudhary B, Hanski ML, Zeitz M-, Hanski C. Proliferation rate but not mismatch repair affects the long-term response of colon carcinoma cells to 5FU treatment. Cancer Lett 2012;6: 320:56-64.
21- Correale P, Aquino A, Giuliani A, Pel-legrini M, Micheli L, Cusi MG, et al. Treatment of colon and Breast carci-noma cells with 5-fluorouracil enhances expression of carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-A (*)02.01 restricted CEA-Peptide-specific cytot-oxic T cells in vitro. Int J Cancer 2003; 104: 437-45.
22- Sato S, Itamochi H, Kigawa J, Oishi T-, Shimada M, Sato S, et al. Combina-tion chemotherapy of oxaliplatin and 5-fluorouracil may be an effective regim-en for mucinous adenocarcinoma of the ovary: a potential treatment strategy. Cancer Sci 2009; 100:546-51.
23- Lamberti M, Porto S, Marra M, Zapp-avigna S, Grimaldi A, Feola D, et al. 5-

Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. J Exp Clin Cancer Res 2012; 31:60-7.

24- Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins.Br J Cancer 1998 ;78: 992-8.

25- Adachi Y, Taketani S, Oyaizu H, Ikebukuro K, Tokunaga R, Ikehara. S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma inuced by 5fu and /or IFN-gamma throughcaspase 3 and caspase 8. Int J Oncol 1999; 15:1191-7.

26- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in Leishmania donovani Promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 852-9.

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

28- Maroufi 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: 33-40. (Persian)

29- Ebrahimisadr 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]. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 15:1-10. (Persian)

30- Isavand Heidari F, Ghaffarifar F, Dalimi A, Mortazavi Dehkordi N, Ghasmi Nikoo S. J Mazandaran Univ Med Sci 2012;15:33-43. (Persian)

Cytotoxic Effects of 5-Fluorouracil on Major Promastigotes and Induction of Apoptosis

Delavari M[1], Dalimi A[1], Ghaffarifar F[1], Sadraei J[1]*

(Recived: 16March, 2013 Accepted: 16 June, 2013)

Abstract

Introduction: Cutaneous leishmaniasis is considered as a public health problem in Iran. Antimony compounds are commonly used in the treatment of this disease. However, using the drugs is associated with limitations and several side effects and also there is the risk of disease recurrence. So, exploring new and effective drugs is of a great importance. In the present study, the effect of 5-fluorouracil on the growth and apoptosis induction of Leishmania major promastigotes was evaluated.

Materials and Methods: Different concentrateons of 5–fluorouracil (12 , 25, 50 and 100 µg/ml) were tested at three times (24, 48 and 72h) and half maximal inhibitory concentration (IC50) was calculated by counting the number of parasites and lethality percent of the drug on promastigotes was determined by MTT [3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide] assay. Flow cytometry was applied to investigate the induction of apoptosis on the parasite.

Findings: 24 hours after culturing, the parasites count was 1.25×10^6 per ml in the control group and the numbers were counted 0.73×10^6 and $0.4\times10^{6\ at}$ the concentrations of 12 and 100 µg/ml, respectively. The IC50 were measured to be 26.17µg/ml after 24h. Flow cytometry analysis showed that the 5-fluorouracil induced apoptosis in Leishmania major promastigotes so that apoptosis was 3.64% in the control group 72 hours after parasite culturing while, apoptosis was 74.5% at the 100 µg/ml concentration of 5-fluorouracil .

Discussion & Conclusion: According to our results, 5-fluorouracil has anti-Leishmanial effects and it can be suggested as a new drug for in vivo purposes against Leishmania parasite.

Keywords: Leishmania major, 5- fluorouracil, Apoptosis, flow cytometry

1.Dept of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran