

## Evaluation of the Paraquat Effect on *Leishmania major* Promastigotes and HUVECs Viability under in vitro Condition

Niapour A<sup>1</sup>, Amirshahrokhi K<sup>2</sup>, Azari Rad M<sup>3</sup>, Mohammadi-ghalehbin B\*<sup>4</sup>

1. Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

3. General Practitioner, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

4. Research Laboratory for Medical Parasitology, Department of Microbiology & Medical Parasitology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

\* **Corresponding Author.** Tel: +984533534684, Fax: +984533534681, E-mail: b.mohammadi@arums.ac.ir

Received: Dec 21, 2018 Accepted: Mar 11, 2019

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Pentavalent antimonials are the first-line drugs for treatment of leishmaniasis, which have multiple side effects such as drug toxicity. Moreover, parasite resistance to these drugs is rising around the world. Second-line drugs, including Amphotericin B and pantamidine have also side effects and expensive for patients. According to the cytotoxic effects of paraquat, this study was conducted to evaluate the effect of paraquat on *Leishmania major* promastigotes and HUVECs viability.

**Methods:** A number of  $2.5 \times 10^6$  of *Leishmania major* promastigotes were treated in each well of 96 well plates with different concentrations of paraquat. Cells were incubated for 48 hours in 24 °C. MTT test was performed for evaluating paraquat impact on promastigotes. The absorbance was measured using a microplate reader at 570 nm. The trypan blue staining assay was performed to evaluate the number of viable *Leishmania major* promastigotes following paraquat treatment. Furthermore, the effect of paraquat concentrations on HUVECs viability was evaluated under the cell culture condition.

**Results:** The results of the MTT test showed that increasing concentrations of paraquat could significantly reduce the viability and the number of *Leishmania major* promastigotes in comparison to control group ( $p < 0.05$ ). In this study, the  $IC_{50}$  for *Leishmania major* promastigotes was calculated as 272.46  $\mu\text{g/ml}$ . Trypan blue results were in line with the finding of MTT assay. Moreover, we found that HUVECs were susceptible to paraquat ( $IC_{50} = 188.99 \mu\text{g/ml}$ ).

**Conclusion:** Paraquat has a strong inhibitory effect on *Leishmania major* promastigotes and human endothelial cells. Although more comprehensive studies on the effects of the topical use of paraquat on *Leishmania major* lesions in animal model and its side effects are necessary.

**Keywords:** *Leishmania major*; Paraquat; MTT Assay

## ارزیابی تاثیر پاراکوات بر بقاء پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* و سلول‌های HUVEC در شرایط آزمایشگاهی

علی نیاپور<sup>۱</sup>، کیوان امیرشاهرخی<sup>۲</sup>، محمد آذری راد<sup>۳</sup>، بهنام محمدی قلعه بین<sup>۴\*</sup>

۱. آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
  ۲. گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
  ۳. پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
  ۴. آزمایشگاه تحقیقاتی انگل شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- \* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۸۴ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۸۱ پست الکترونیک: b.mohammadi@arums.ac.ir

### چکیده

**زمینه و هدف:** داروهای خط اول درمان لیشمانیوز ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان هستند که دارای عوارض جانبی متعدد از جمله سمیت دارویی هستند. از طرفی مقاومت به این داروها در سراسر جهان رو به افزایش می‌باشد. داروهایی مانند آمفوتریسین ب و پنتامیدین که در خط دوم درمان قرار می‌گیرند، نیز دارای عوارض جانبی بوده یا هزینه بالایی را به بیمار تحمیل می‌کنند. با توجه به اثرات سمی پاراکوات، این مطالعه با هدف تاثیر آن روی زنده مانی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* و سلول‌های HUVEC انجام گرفت.

**روش کار:** پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا* به تعداد  $10^6 \times 2/5$  در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه ای تحت مواجهه با غلظت‌های مختلف پاراکوات قرار گرفتند. تیمار به مدت ۴۸ ساعت و در دمای  $37^\circ\text{C}$  انجام شد. سپس آزمایش MTT برای ارزیابی میزان تاثیر پاراکوات انجام گردید. جذب نوری با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. از رنگ آمیزی تریپان بلو جهت بررسی تعداد پروماستیگوت‌های زنده پس از تیمار با پاراکوات استفاده شد. همچنین، تاثیر غلظت‌های مختلف پاراکوات بر بقاء سلول‌های HUVEC در شرایط کشت بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج تست MTT نشان داده که غلظت‌های افزایشی پاراکوات به صورت معنی‌داری می‌تواند بقاء انگل‌های پروماستیگوت را در مقایسه با گروه کنترل تحت تاثیر قرار دهد. در این مطالعه، غلظت  $IC_{50}$  پاراکوات بر پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا* به میزان  $272/46$  میکروگرم بر میلی لیتر برآورد گردید. یافته‌های رنگ آمیزی تریپان بلو با نتایج روش MTT مطابقت داشت. علاوه بر این، ما متوجه شدیم که HUVEC ها حساس به پاراکوات هستند ( $IC_{50} = 188.99 \mu\text{g/ml}$ ). **نتیجه گیری:** پاراکوات اثرات مہاری قوی روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* و سلول‌های اندوتلیال انسانی دارد. آزمایشات بیشتر در زمینه تاثیر پاراکوات روی زخم‌های حاصل از *لیشمانیا ماژور* در مدل‌های حیوانی و اثرات جانبی آن در استفاده موضعی این دارو لازم می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** *لیشمانیا ماژور*، پاراکوات، روش MTT

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰

دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۳۰

### مقدمه

بین میزبانان پستاندار توسط پشه‌های خاکی ماده صورت می‌گیرد [۱،۲]. با توجه به گونه عامل لیشمانیوز، این بیماری به اشکال مختلف بالینی دیده می‌شود که از اشکال خود محدود شونده جلدی تا

لیشمانیوز یک بیماری منتقله از طریق بندپایان می‌باشد و حدود بیست گونه انگل *لیشمانیا* در ایجاد اشکال گوناگون آن نقش دارند. انتقال لیشمانیوز در

اشکال مخاطی- جلدی، جلدی منتشره و احشائی تهدیدکننده زندگی بروز می کند [۳]. لیشمانیوز در بیش از ۸۸ کشور که اغلب جزو کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری هستند اندمیک بوده [۴] و بروز آن از ۷۰۰۰۰ تا ۱۳۰۰۰۰۰ نفر و میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری ۲۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ در کل جهان در سال می باشد [۵]. با توجه به نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک، ۱۲ میلیون بیمار مبتلا به لیشمانیوز در جهان وجود دارد و ۳۵۰ میلیون نفر در مناطق لیشمانیا خیز زندگی می کنند و در معرض تهدید بیماری می باشند. ایران جزو کشورهایی است که لیشمانیوز جلدی در آن شایع است همچنین لیشمانیوز احشائی در دو کانون شمالغرب (استان اردبیل و استان آذربایجان شرقی) و جنوب کشور (استان فارس و بوشهر) اندمیک بوده و آلودگی سگ سانان به عنوان مخازن انگل تقریباً در سراسر کشور گزارش شده است [۶-۸]. حدود ۹۵ درصد موارد لیشمانیوز جلدی در امریکای لاتین، کشورهای حوزه مدیترانه، خاورمیانه و آسیای مرکزی رخ می دهد و دو سوم موارد جدید از شش کشور افغانستان، الجزایر، برزیل، کلمبیا، ایران و سوریه گزارش می شود [۹]. سالانه حدود ۲۰۰۰۰ مورد لیشمانیوز جلدی از ایران گزارش می شود ولی آمار واقعی آن می تواند چندین برابر این رقم باشد [۵]. در ایران هر دو نوع لیشمانیوز جلدی شهری و روستایی دیده می شود، نوع روستایی در ۱۵ استان شایع است ولی نوع شهری تقریباً در تمام مناطق شهری وجود دارد [۱۰]. ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان (گلو کانتیم و پنتوستام) داروی انتخابی در درمان لیشمانیوزها می باشند که به صورت عضلانی یا داخل وریدی تزریق می شوند و با غلظت بالا در پلاسما، کبد و طحال گسترش می یابد. در کبد این دارو به آنتیموان سه ظرفیتی تبدیل می شود که دارای خاصیت سمی بیشتری می باشد [۱۱]. درمان طولانی مدت با دارو باعث تجمع آن در بافت بخصوص در کبد و طحال می شود و عوارض جانبی آن شامل تهوع، درد

شکم، درد عضلانی، التهاب پانکراس، آریتمی قلبی و هپاتیت می باشد [۱۲]. از طرفی تاثیر متغیر در درمان لیشمانیوز احشائی و جلدی و همچنین افزایش موارد مقاومت به دارو در سالهای اخیر درمان با ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان را تحت تاثیر قرار داده است و منجر به کاهش مصرف دارو و یا حتی ترک درمان شده است [۱۳]. بر طبق نظر سازمان جهانی بهداشت نیز تاثیر درمانی گلو کانتیم در کشورهای مختلف متفاوت می باشد و پروتوکلهای درمانی مختلف براساس مناطق جغرافیایی خاص تعیین می شوند [۱۴]. آنتیموانهای ۵ ظرفیتی هنوز در تعداد زیادی از کشورهای دنیا، مناطق اندمیک لیشمانیازیس از جمله ایران، به عنوان داروی خط اول درمان مورد استفاده قرار می گیرند. اما در برخی از کشورها از جمله هندوستان به واسطه عدم پاسخ لیشمانیا دونووانی در برابر گلو کانتیم و ان متیل گلو کامین، تقریباً کنار گذاشته شده اند [۱۵].

آمفوتریسین B از داروهای خط دوم درمان و از ماکرولیدهای پلی ان می باشد که خیلی جزئی از دستگاه گوارش جذب می شود و تجویز آن به صورت داخل وریدی صورت می گیرد. مصرف آمفوتریسین B باعث عوارض جانبی از قبیل تب و لرز، ترومبوفیلیت و گاهی اوقات مسمومیت های جدی مانند میو کاردیت، هیپوکالمی شدید، ناکارآمدی کلیه و حتی مرگ می شود [۱۶]. پنتامیدین از دیگر داروهای خط دوم درمان لیشمانیوز می باشد که به صورت تزریق داخل عضلانی یا داخل وریدی تجویز می شود. درمان با این دارو باعث درد عضلانی، درد در محل تزریق، تهوع، سردرد، در بعضی موارد احساس مزه فلز، احساس سوزش، بی حسی و کاهش فشار خون می شود. همچنین از عوارض آن به هیپوگلیسمی برگشت پذیر در ۲ درصد از موارد و دیابت ملیتوس وابسته به انسولین غیر قابل برگشت و مرگ اشاره کرد. تاثیر کم و سمیت از علل کاهش مصرف این دارو می باشد [۱۷].

میلتفوسین که اخیراً برای درمان لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته است از طریق دهان و به صورت خوراکی تجویز می‌شود. از عوارض مصرف این دارو می‌توان به اختلالات گوارشی و مسمومیت کلیوی اشاره کرد. همچنین این دارو تراژون بوده و در هر بیماری قابل استفاده نمی‌باشد [۱۷]. در پاره ای از موارد پنتامیدین، آمفوتریسین ب و پارامومیسین علی‌رغم سمیت بالایشان برای میزبان به عنوان گزینه‌های دوم و در موارد بروز مقاومت به کار می‌روند. اخیراً فرم لیپوزومال آمفوتریسین ب و پنتوستام ساخته شده که عوارض دارویی کمتری دارند ولی هزینه درمان با این اشکال دارویی بالا می‌باشد [۱۸]. پاراکوات یا -N,N-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride یک ترکیب ارگانیک با فرمول  $(C_6H_7N)_2Cl_2$  بعنوان یک علف کش بطور وسیع استفاده می‌گردد. این ترکیب بطور غیر اختصاصی می‌تواند باعث آسیب یا مرگ سلول‌های گیاهی و حیوانی گردد. انگل لیشمانیا برای ادامه حیات خود به مواد آنتی‌اکسیدان نیاز دارد تا از آسیب رادیکال‌های آزاد در امان بماند. پاراکوات موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در داخل و خارج سلول شده و آنتی‌اکسیدان‌ها را از بین می‌برد و از این طریق موجب از بین رفتن سلول‌های لیشمانیا می‌گردد [۱۹]. همچنین پاراکوات از طریق اختلال عملکرد میتو‌کندری سلول‌ها، تحریک تولید انواع سایتوکاین‌های پیش التهابی، فعال سازی Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) و ایجاد یک عامل سمی در داخل سلول بنام Hypochlorous Acid در از بین بردن سلول‌ها نقش دارد [۲۰-۲۲]. در دو مطالعه‌ای که در آنها اثر پاراکوات روی لیشمانیا شاگاسی بررسی شده است نشان داده شده است که پاراکوات با افزایش تولید رادیکال‌های سوپراکساید باعث کاهش میزان بقای سلول‌های لیشمانیا گردیده است [۲۴،۲۳]. با توجه به اثر سیتوتوکسیک و ضد سرطانی پاراکوات [۲۶،۲۵] این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات

ضد لیشمانیایی پاراکوات در مقایسه با داروی گلوکانتیم با استفاده از روش رنگ سنجی<sup>۱</sup> MTT انجام شد.

### روش کار

پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مائور (IR75) از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه گردید و در محیط کشت BHI<sup>۲</sup> در انکوباتور ۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری و پاساژ داده شد. انگل‌ها در فاز ایستا برای انجام آزمایشات استفاده شدند.

### بررسی اثر کشندگی رقت‌های مختلف پاراکوات روی انگل لیشمانیا مائور به روش MTT

اثر کشندگی پاراکوات بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مائور در شرایط *in vitro* بررسی شد. بدین منظور، رقت‌های سریالی پاراکوات با مقادیر ۳۹، ۵۸/۶، ۷۸/۱، ۱۱۷/۲، ۱۵۶/۲، ۲۴۳/۳، ۳۱۲/۵، ۴۶۸/۷، ۶۲۵، ۹۳۷/۵ و ۱۲۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر در محیط BHI تهیه شد. تعداد  $10^6 \times 2/5$  از پروماستیگوت‌های لیشمانیا مائور در فاز ایستا در ۱۰۰ میکرولیتر محیط BHI در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ چاهکی کشت داده شدند. حجم ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف پاراکوات به هر چاهک اضافه و در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در چاهک شاهد تنها محیط کشت و در چاهک کنترل محیط کشت و انگل اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت از انکوباسیون، میکروپلیت توسط سانتریفوژ یخچال دار در دمای چهار درجه سانتیگراد با دور ۲۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی به آرامی و به کمک سرنگ تخلیه شد و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت دو میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات به هر چاهک اضافه گردید. میزان رنگی که تولید می‌شود با میزان زنده بودن سلول‌ها و فعالیت متابولیسی سلول‌ها متناسب است و توسط روش

<sup>۱</sup> 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide

<sup>۲</sup> Brain Heart Infusion Broth

آنتی‌بیوتیک (Pen/Strep) یک درصد و انکوباتور (شرکت Memmert آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری و کشت شدند. به طور خلاصه، تعداد  $5 \times 10^3$  سلول درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای رشد داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پاراکوات (۳۹، ۵۸/۶، ۷۸/۱، ۱۱۷/۲، ۱۵۶/۲، ۲۴۳/۳، ۳۱۲/۵، ۴۶۸/۷، ۶۲۵، ۹۳۷/۵ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. ۴۸ ساعت بعد از مواجهه بقا سلول‌ها با افزودن MTT سنجیده شد [۲۸، ۲۹].

#### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین بیان و ارزش احتمالی کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. جهت بررسی نتایج از نرم افزار آماری SPSS-15 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی استفاده شد.

#### یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی اثر پاراکوات در ۱۱ غلظت مختلف بر کاهش میزان بقای پروماستیگوت‌های انگل

#### لیشمانیا ماژور به روش MTT

اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات بر روی حیات سلولی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* به روش سنجش MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت ۱۵۶/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر و رقت‌های بالاتر پاراکوات باعث کاهش درصد حیات سلولی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* گردید که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). غلظت‌های بالاتر پاراکوات اثر مخربی بر کاهش درصد حیات سلولی داشت که در نمودار ۱ نشان داده شده است (نمودار ۱). در روش MTT،  $IC_{50}^E$  پاراکوات بر روی پروماستیگوت‌های انگل

کالریمتریک قابل اندازه‌گیری می‌باشد. پلیت‌ها برای مدت چهار ساعت در انکوباتور و در وضعیت تاریکی نگهداری شد. پس از اتمام انکوباسیون، حجم ۱۰۰ میکرولیتر از حلال DMSO اضافه شد و پس از مدت پنج دقیقه میزان جذب نوری که بیانگر فعالیت متابولیکی پروماستیگوت‌ها است، توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت (ELISA Reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. آزمایشات به صورت تریپلیکات انجام شد و سه بار تکرار گردید [۲۷].

#### بررسی میزان زنده مانی پروماستیگوت‌ها

برای رنگ‌آمیزی سلول‌های غیرزنده از ماده تریپان بلو استفاده می‌شود. در این روش، زنده‌مانی سلول توسط شمارش پروماستیگوت‌هایی که رنگ را جذب نکرده اند، در زیر میکروسکوپ انجام می‌شود. روش آزمایش به این صورت بود که پروماستیگوت‌ها با تعداد  $2/5 \times 10^6$  سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط BHI تحت مواجهه با رقت‌های مختلف پاراکوات قرار گرفتند و در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از پایان ۴۸ ساعت انکوباسیون، حجم ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی هر یک از چاهک‌های با غلظت مختلف پاراکوات با حجم برابر محلول تریپان بلو چهار درصد مخلوط و روی لام گذاشته شد و در نهایت در زیر میکروسکوپ شمارش و نسبت پروماستیگوت‌های غیر زنده به کل پروماستیگوت‌ها محاسبه گردید [۲۷].

#### بررسی میزان بقای سلول‌های HUVEC در مواجهه با غلظت‌های مختلف پاراکوات

جهت بررسی سمیت سلولی از سلول‌های اندوتلیالی انسانی ( $HUVEC^1$ ) استفاده شد. این رده سلولی از انستیتو پاستور خریداری شد و پس از ذوب شدن در فلاسک حاوی محیط کشت  $DMEM^2$  با مقدار گلوکز بالا حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی ( $FBS^3$ ) و

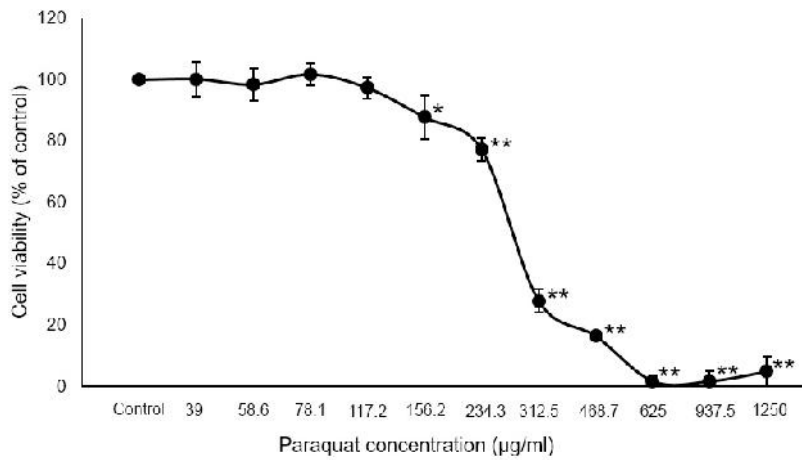
<sup>1</sup> Umbilical Vein Endothelial Cells

<sup>2</sup> Dulbecco's Modified Eagle's Medium

<sup>3</sup> Fetal Bovine Serum

<sup>4</sup> Inhibitory Concentration

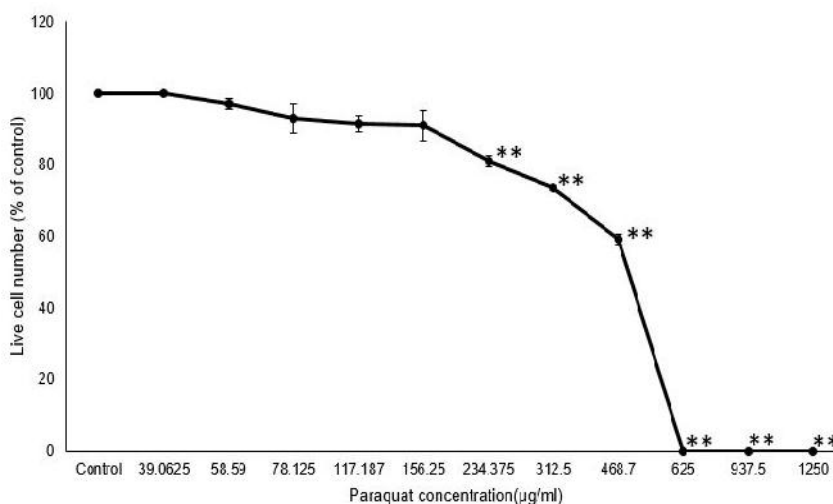
لیشمانیا مائور ۲۷۲/۴۶ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد.



نمودار ۱. تاثیر کشندگی غلظت‌های مختلف پاراکوات بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا مائور به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. P\* کمتر از ۰/۰۵ و P\*\* کمتر از ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

پروماستیگوت‌های زنده لیشمانیا مائور گردید که از غلظت ۲۳۴/۳۷۵ در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). غلظت‌های ۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و بالاتر پاراکوات اثر کشنده ای بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا داشت به گونه‌ای که تقریباً سلول زنده ای در این غلظت‌ها دیده نشد (نمودار ۲).

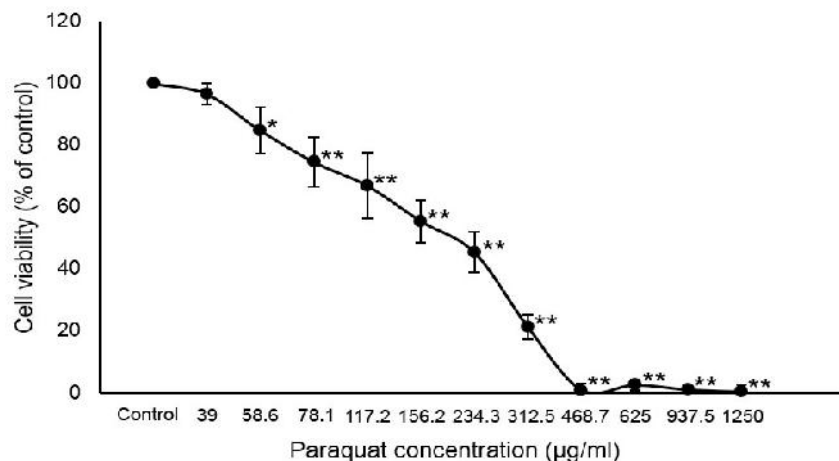
اثر پاراکوات در ۱۱ غلظت مختلف بر کاهش تعداد پروماستیگوت‌های زنده انگل لیشمانیا مائور به روش رنگ‌آمیزی حیاتی با تریپان بلو و شمارش با هموسایتومتر اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات بر روی حیات سلولی پروماستیگوت‌های لیشمانیا مائور به روش رنگ‌آمیزی حیاتی با تریپان بلو و شمارش با هموسایتومتر بررسی شد. نتایج نشان داد که رقت‌های مختلف پاراکوات باعث کاهش تعداد



نمودار ۲. تاثیر کشندگی غلظت‌های مختلف پاراکوات بر روی تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا مائور به روش رنگ‌آمیزی حیاتی با تریپان بلو و شمارش با هموسایتومتر پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. P\* کمتر از ۰/۰۵ و P\*\* کمتر از ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). غلظت‌های بالاتر پاراکوات اثر قوی‌تری بر کاهش درصد حیات سلولی داشت که در نمودار ۳ مشخص می‌باشد در روش MTT،  $IC_{50}$  پاراکوات بر روی سلول‌های HUVEC انسانی ۱۸۸/۹۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد (نمودار ۳).

نتایج حاصل از بررسی اثر پاراکوات در ۱۱ غلظت مختلف بر بقای سلول‌های HUVEC انسانی به روش MTT اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات بر روی حیات سلولی در سلول‌های HUVEC انسانی به روش سنجش MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که رقت‌های مختلف پاراکوات باعث کاهش درصد حیات سلولی سلول‌های HUVEC انسانی گردید که در مقایسه با گروه کنترل



نمودار ۳. تاثیر کشندگی غلظت‌های مختلف پاراکوات بر روی بقای سلول‌های HUVEC به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون. \* P کمتر از ۰/۰۵ و \*\* P کمتر از ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

## بحث

مطالعات موجود درباره تاثیر پاراکوات بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا بسیار محدود است. در مطالعه‌ای برای اثبات اهمیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز داخل گلايکوزوم‌های لیشمانیا شاگاسی<sup>۱</sup> نتایج مطالعه پلویس<sup>۲</sup> و همکاران، نشان داد که اضافه شدن پاراکوات به محیط کشت لیشمانیا شاگاسی موجب کاهش معنی‌دار رشد این پارازیت شد. در این مطالعه مشخص شد که پاراکوات با افزایش تولید رادیکال‌های سوپر اکساید ( $O^{\cdot-}$ ) باعث کاهش میزان بقای سلول‌های لیشمانیا گردید که ژن مولد آنزیم سوپراکساید دیسموتاز آنها knockout شده بود [۲۳]. یافته‌های تحقیقات پارامچوک<sup>۳</sup> و همکاران نیز همسو با نتایج پلویس و بیانگر کاهش معنی‌دار رشد

در مطالعه حاضر تأثیر پاراکوات بر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مائورر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تأثیر پاراکوات با  $IC_{50}$  برابر با ۲۷۲/۴۶ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی لیشمانیا مائورر به روش MTT نسبت به داروی گلوکانتیم با  $IC_{50}$  برابر با ۷۱/۰۱ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حدود ۲۶۰ برابر بیشتر است [۲۷]. نتایج حاصل از تست MTT با استفاده از روش شمارش سلولی و با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو تأیید گردید. همچنین مشخص گردید سلول‌های HUVEC با  $IC_{50}$  = ۱۸۸/۹۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با پروماستیگوت‌های لیشمانیا حساسیت بیشتری در برابر پاراکوات دارند.

<sup>1</sup> *Leishmania chagasi*

<sup>2</sup> Plewes

<sup>3</sup> Paramchuk

۳- ثابت شده است که پاراکوات باعث تحریک تولید انواع سایتوکاین‌های پیش التهابی مثل IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 می‌گردد. همچنین این ماده باعث فعال‌سازی Transcription Factor مهم داخل سلولی بنام Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) می‌گردد. پاراکوات باعث افزایش میزان آنزیم Myeloperoxidase (MPO) شده و در نتیجه باعث تشکیل یک عامل سمی در داخل سلول بنام Hypochlorous Acid (HOCl) می‌شود. تمام این عوامل التهابی می‌توانند باعث تحریک سیستم ایمنی علیه سلول‌هایی گردند که مولکول پاراکوات وارد آنها شده است [۲۲]. لازم به ذکر است که مواد بسیاری که دارای سمیت بالایی برای انسان بوده‌اند پس از مطالعات فراوان و تغییرات ساختاری که بر روی فرمول شیمیایی آنها انجام گرفته است امروزه بعنوان دارو در حیطه شیمی درمانی کاربرد پزشکی پیدا کرده‌اند. از این رو این مطالعه طراحی شد تا اثر پاراکوات بر روی انگل *لیشمانیا* که یکی از مقاوم‌ترین انگل‌های آسیب رسان و جدی برای سلامت انسان می‌باشد مورد بررسی اولیه قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که پاراکوات ( $IC_{50} = 272/46$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی زنده‌مانی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا مائورور* موثر می‌باشد. این اثر نسبت به داروی گلوکانتیم ( $IC_{50} = 71/01$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حدود ۲۶۰ برابر بیشتر است. آزمایشات بیشتر در زمینه تأثیر پاراکوات روی زخم‌های حاصل از *لیشمانیا مائورور* در مدل‌های حیوانی و اثرات جانبی آن در استفاده موضعی این دارو لازم می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه مقطع دکتری حرفه ای به شماره ۰۷۳۸ و کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1396.171 می‌باشد. نویسندگان

*لیشمانیا شاگاسی* در حضور پاراکوات بود و نقش سوپر اکساید دیسموتازهای متصل به آهن را در محافظت انگل در برابر رادیکال‌های سوپر اکساید به اثبات رساندند [۲۴]. نتایج مطالعه حاضر روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا مائورور* همسو با نتایج مطالعات پلوپس و همکاران و همچنین پارامچوک و همکاران روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا شاگاسی* در جهت کاهش بقا و تعداد انگل بود.

بررسی متون نشان می‌دهد که اکثر مطالعات بر روی کاهش سمیت این ماده در حیوانات و بویژه انسان متمرکز است. با توجه به روند کشف و ساخت داروهای شیمی درمانی و با توجه به مکانیسم سمیت پاراکوات به نظر می‌رسد این ماده می‌تواند برای از بین بردن انگل‌هایی که به داروها مقاوم هستند مورد بررسی قرار گیرد.

با توجه به یافته‌های موجود مکانیسم سمیت پاراکوات بدین صورت می‌باشد:

۱- مولکول پاراکوات توسط سیستم‌های آنزیمی مختلفی مثل NADP-cytochrome P450 reductase و Nitric Oxide Synthase (NOS) متابولیزه می‌شود. متابولیسم پاراکوات منجر به تولید یک رادیکال کاتیونی از پاراکوات شده و این کاتیون در داخل سلول دوباره اکسیده شده و تولید سوپراکساید می‌کند. همچنین در طی این روند مقدار زیادی انواع دیگر رادیکال‌ها مثل رادیکال هیدروکسیل ( $HO^\bullet$ ) و پراکسی نیتريت ( $ONOO^-$ ) ساخته می‌شود. تولید مقدار زیاد انواع رادیکال‌های اکسیژن و نیتروژن توسط پاراکوات منجر به سمیت و آسیب شدید سلول‌ها و در نتیجه بافت‌های مختلف می‌گردد [۲۰].

۲- پاراکوات باعث اختلال عملکرد میتوکندری سلول‌ها می‌گردد. ثابت شده است که پاراکوات می‌تواند باعث کاهش پتانسیل غشا و افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری‌ها گردد. همچنین پاراکوات باعث تحریک مسیر داخلی آپوپتوزیس میتوکندریایی می‌شود [۲۱].



مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به لحاظ تامین مالی پروژه تشکر و قدردانی می کنند.

## References

- 1-Talmi-Frank D, Kedem-Vaanunu N, King R, Bar-Gal GK, Edery N, Jaffe CL, et al. *Leishmania tropica* infection in golden jackals and red foxes, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2010 Dec;16(12):1973-5.
- 2-Labony SS, Begum N, Rima UK, Chowdhury GA, Zakir Hossain M, Habib MA, et al. Apply traditional and molecular protocols for the detection of carrier state of visceral leishmaniasis in black Bengal goat. *J Agric Vet Sci*. 2014 Mar-Apr; 7: 13–18.
- 3- Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, McMahan-Pratt D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 Apr;96 Suppl 1:S3-7.
- 4- World Health Organization. Control of the leishmaniases. Geneva: World Health Organization; 2010. [Online] Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng).
- 5- World Health Organization. Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2015. [Online] Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> [Accessed on 26th December, 2015]
- 6- Badirzadeh A, Mohebbali M, Ghasemian M, Amini H, Zarei Z, Akhoundi B, et al. Cutaneous and post kala-azar dermal leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in endemic areas of visceral leishmaniasis, northwestern Iran 2002–2011: a case series. *Pathog Glob Health*. 2013 Jun; 107(4): 194–197.
- 7- Mohammadi-Ghalehbin B, Hatam GR, Sarkari B, Mohebbali M, Zare Z, Jaberipour M, et al. A *Leishmania infantum* FML-ELISA for the detection of symptomatic and asymptomatic canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Iran. *Iran J Immunol*. 2011 Dec;8(4):244-50.
- 8- Mohammadi-Ghalehbin B, Hatam G, Sarkari B, Mohebbali M, Zarei Z, Bohlooli S. Cytokine Profile of *Leishmania infantum* Fucose-Mannose Ligand in Vaccinated Dogs in the Northwest of Iran. *Iran J Immunol*. 2017 Dec;14(4):293-305.PMID: 29276182.
- 9- Norouzinezhad F, Ghaffari F, Norouzinejad A, Kaveh F, Gouya MM. Cutaneous leishmaniasis in Iran: Results from an epidemiological study in urban and rural provinces. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016; 6(7): 614–619.
- 10- Shirzadi MR. National guidelines for cutaneous leishmaniasis surveillance in Iran, 1<sup>st</sup> ed. Tehran. Raze-nahan, 2012:10. Available from: [http://vch.iuums.ac.ir/uploads/ketab\\_salak.pdf](http://vch.iuums.ac.ir/uploads/ketab_salak.pdf). [Full text in Persian]
- 11- Berman JD, Edwards N, King M, Grogl M. Biochemistry of pentostam resistant *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 159-64.
- 12- Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. Epidemiological, clinical and pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res*. 2004; 120: 166-72.
- 13- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003; 19: 502-8.
- 14- Jaffary F, Nilforoushzadeh MA, Siadat AH, Haftbaradaran E, Ansari N, Ahmadi E. A comparison between the effects of glucantime, topical trichloroacetic acid 50% plus glucantime, and fractional carbon dioxide laser plus glucantime on cutaneous leishmaniasis lesions. *Dermatol Res Pract*. 2016 Apr; 2016: 6462804.
- 15- Natera S, Machuca C, Padron-Nieves M, Romero A, Diaz E, Ponte-Sucre A. *Leishmania spp.*: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Jun;29(6):637-642.
- 16- Balaña-Fouce R, requera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 435-43.
- 17- Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. *Indian J Med Res*. 2006; 123: 345-52.
- 18- Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol*. 2003 May; 19(5):232-9.
- 19- Hassan HM, Fridovich I. Paraquat and Escherichia coli. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry*. 1979;254(21):10846-52.

- 20- Wilks MF, Tomenson JA, Fernando R, Ariyananda P, Berry DJ, Buckley NA, et al. Formulation changes and time trends in outcome following paraquat ingestion in Sri Lanka. *Clinical Toxicology*. 2011;49(1):21-8.
- 21- Huang C-L, Lee Y-C, Yang Y-C, Kuo T-Y, Huang N-K. Minocycline prevents paraquat-induced cell death through attenuating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Toxicology letters*. 2012;209(3):203-10.
- 22- Amirshahrokhi K, Khalili A-R. Carvedilol attenuates paraquat-induced lung injury by inhibition of proinflammatory cytokines, chemokine MCP-1, NF- B activation and oxidative stress mediators. *Cytokine*. 2016;88:144-53.
- 23- Plewes KA, Barr SD, Gedamu L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infection and immunity*. Infect Immun. 2003 Oct;71(10):5910-20.
- 24- Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1997 Dec 1;90(1):203-21.
- 25- Cavalli RD, Fletcher K. An effective treatment for paraquat poisoning. In: Autor A.P., editor. *Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity*. New York: Academic Press; 1977. pp. 213–234.
- 26- Yang JO, Gi HW, Kang MS, Lee EY, Hong SY. Serum total antioxidant statuses of survivors and nonsurvivors after acute paraquat poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2009 Mar;47(3):226-9.
- 27- Niapour A, Bohlooli S, Sharifi Pasandi M, Mohammadi-ghalehbin B. In vitro Anti Leishmanial Effect of *Agrostemma githago* Extract on *Leishmania major* Promastigotes by Cell Count and MTT Assay. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2018; 28 (165) :13-23.
- 28- Niapour N, Mohammadi-Ghalehbin B, Golmohammadi MG, Gholami MR, Amani M, Niapour A. An efficient system for selection and culture of Schwann cells from adult rat peripheral nerves. *Cytotechnology*. 2016 Aug;68(4):629-36.
- 29- Niapour N, Niapour A, Sheikhkanloui Milan H, Amani M, Salehi H, Najafzadeh N, et al. All trans retinoic acid modulates peripheral nerve fibroblasts viability and apoptosis. *Tissue Cell*. 2015 Feb;47(1):61-5.