

The Effect of Artemether-induced Apoptosis in Promastigotes of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) under In-vitro Conditions

Parisa Ebrahimisadr¹, Fatemeh Ghaffarifar^{2*}, Zuhair Mohammad Hassan³, Nasibeh Beheshti¹

1- M.Sc, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: ghafarifar@modares.ac.ir

Received: 14/Jan/2012, Accepted: 26/Jun/2012

Abstract

Objective: Leishmaniasis is one of the significant causes of morbidity and mortality in several countries. It is an important problem in endemic areas such as Iran. The goal in treatment of leishmaniasis is to reduce the disease period and leave no evidence of any remaining scars or lesions. A derivative of artemisinin is artemether. Scientists believe that the strong action of artemether against parasites is due to the presence of an endoperoxide bridge. Due to problems in the treatment of *Leishmania major*, in this research we have studied the effect of artemether on *Leishmania major* under in vitro conditions.

Methods: Parasites were cultured in NNN and RPMI, after which artemether at concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100 µg/ml were used for the promastigote assay. Apoptosis was detected by flow cytometry and DNA ladder assay.

Results: The inhibitory concentration (IC₅₀) of artemether was determined to be 25 µg/ml. The percentage of apoptotic promastigotes at 25 µg/ml of artemether was 42.28. The results of DNA fragmentation show that exposure of *Leishmania major* promastigote cells to 25 µg/ml of artemether lead to DNA fragmentation.

Conclusion: We have proven the effect of artemether on apoptosis of *Leishmania major* by flow cytometry and the DNA ladder assay.

Keywords: *Leishmania major*, Artemether, Apoptosis, Flow Cytometry

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 1-10

بررسی اثر داروی آرتمتر بر مرگ سلولی پروماستیگوت‌های سویه ایرانی (MRHO/IR/75/ER) انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

پریسا ابراهیمی صدر^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، زهیر محمد حسن^۳، نسیم بهشتی^۱

۱- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی

Email: ghafarif@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۴/۰۶

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۲۵

چکیده

هدف:

مواد و روش‌ها:

RPMI NNN

۱۰۰ ۵۰ ۲۵ ۱۰ ۵

DNA Ladder

۲۵ (IC₅₀)

نتایج:

۲۵

۴۲/۲۸

DNA

DNA

۲۵

DNA Ladder

نتیجه‌گیری:

کلیدواژگان:

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۱-۱۰

مقدمه

۳۵۰

(Leishmaniasis)

[۱]

[۲]

اثر داروی آرتمتر بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده انگل لیشمانیا ماژور

[۱۵].

]

[۱۶]

(Glucantime) [۵ ۳ (Antimonate)

[۱۸ ۱۷].

(Allopurinol) (Pentostam)

(Amphotericin B) B

(Liposomal Amphotericin B) B

[۱۵]

(Mepacrine) (Berberine Sulphate)

(Emetine Hydrochloride)

(Gentamicin) (Paromomycin)

(Tricholor-Acetic Acid)

()

[۱۰-۳ ۱]

(H⁺)

(*Peschiera australis*)

Altharea (*Peschiera vanherokii*)

(*Altharea officinalis*) (*rosa*)

(*Malvaceae*) (*Leguminosa fabaceae*)

(*Nigella sativa*) (*Lythraceae*)

Pegamum (*Alkanna tinctoria*)

(*Euphorbia mysinites*) (*harmala*)

[۱۴-۱۱]

(Artemether)

(Artemisinin)

(*Artemisia*))

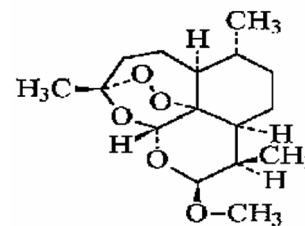
C₁₆H₂₆O₅

(

۱

۲۹۸/۴

(Sesquiterpene Lactone)



آرتمتر

شکل ۱

(Apoptosis)

(Homeostasis)

۰/۵ ۱ DNA ...
۰/۵

۱۰۰ ۱۰۰
۱

نحوه شمارش پروماستیگوت‌ها

(neobar)

۱۰^۴

[۲۰].

۱۰^۶

DNA

DNA Ladder

(Flow Cytometry)

روش انجام آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها

۲۴

(۱۰^۶)

۱۰۰

۲۰ +RPMI1640

۱۰۰

(Fetal Calf Serum) FCS

(*Leishmania major*)

۵۰ ۲۰ ۱۰

۱۰۰

۲۰۰ ۱۰۰)

۱۰۰

(

۲۰۰

(۱۰^۶)

۲۴

۷۲

۴۸

۲۵ - ۲۲

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی داروی آرتمتر

() Exim pharm CO.

(/)

اثر داروی آرتمتر بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده انگل لیشمانیا ماژور

(Loading Buffer)

۴۰

۸۰

۱۰۰

(Gel Doc)

بررسی مرگ سلولی به وسیله فلوسایتومتری

تجزیه و تحلیل آماری

(Oneway ANOVA)

(Mann Whitney)

($P < ۰/۰۵$)

۱۶ SPSS

(Annexin-V) V

(Propidium Iodide: PI)

() Roche

نتایج

نتایج حاصل از آزمون ممانعت از رشد

پروماستیگوت‌ها

۱۰۰ ۵۰ ۲۵ ۱۰ ۵

۷۲ ۴۸ ۲۴ (IC₅₀)

IC₅₀ . ۱

۲۵

بررسی مرگ سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده

لیشمانیا ماژور با استفاده از فلوسایتومتری

۷۲

Annexin V- FLUOS

Phosphate) PBS

۱ ۱۴۰۰ g (Buffered Saline

PI ۱۰۰ V ۱۰۰

۱۵

V

FACSCaliber

Win MDI

ارزیابی سلول براساس محتوی DNA خرد شده

(DNA Fragmentation)

DNA

DNA

Roche Apoptotic DNA Ladder Kit

DNA ()

۱۰ ۲۵ ۵۰)

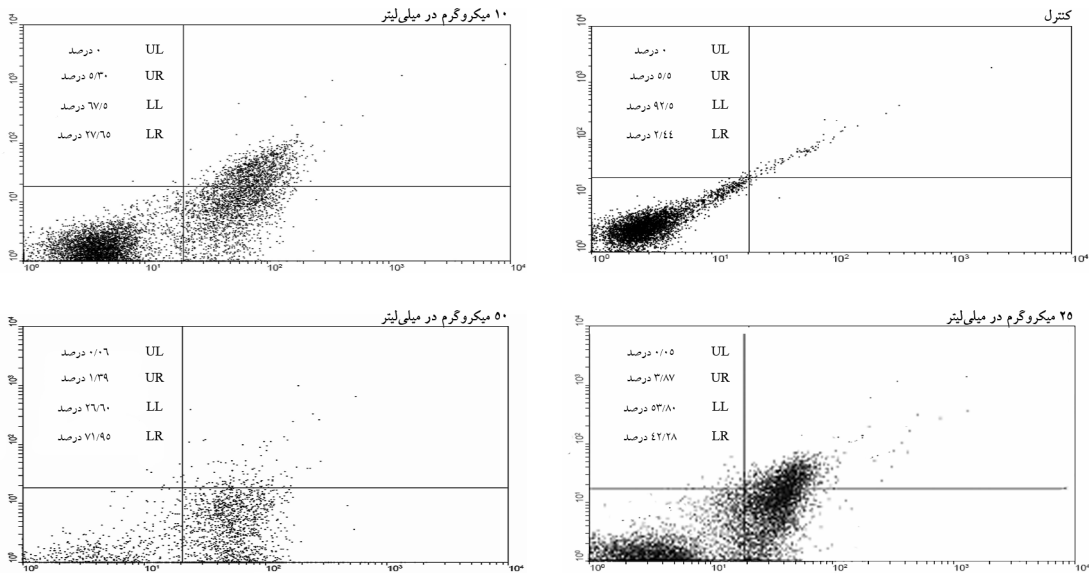
۵ ۵ (

۷۲	(
۲۵	۴۲/۲۸							
۷۱/۹۵	۴۲/۲۸	۲۷/۶۵	۲/۴۴	۵۰	۲۵	۱۰	PI	۰/۰۵
						۱	۲/۴۴	.)
) V

جدول ۱ ۲۴ ۴۸ ۷۲ (x^{۱۰})

۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۰	۵	کنترل	غلظت آرتمر
میکروگرم/میلی لیتر	میکروگرم/میلی لیتر	میکروگرم/میلی لیتر	میکروگرم/میلی لیتر	میکروگرم/میلی لیتر	میکروگرم/میلی لیتر	شمارش پروماستیگوت های زنده
۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۳۴ ± ۰/۰۴	۰/۵۷ ± ۰/۰۷	۰/۶۶ ± ۰/۰۹	۰/۷۹ ± ۰/۱	۱/۳ ± ۰/۱۲	بعد از
۰/۱۹ ± ۰/۰۱	۰/۳۱ ± ۰/۰۲	۰/۵۱ ± ۰/۰۳	۰/۶۳ ± ۰/۰۷	۰/۷۶ ± ۰/۱۱	۱/۷ ± ۰/۱۸	۲۴ ساعت
۰/۱۸ ± ۰/۰۲	۰/۲۹ ± ۰/۰۲	۰/۴۹ ± ۰/۰۶	۰/۶۱ ± ۰/۱۲	۰/۷۴ ± ۰/۱۵	۱/۹ ± ۰/۲	۴۸ ساعت
						۷۲ ساعت

۳
(P<۰/۰۵)



شکل ۱ ۷۲ ۵۰ ۲۵ ۱۰ PI y V x
(Upper Right) UR () (Upper Left) UL
() () (Low Right) LR () (Low Left) LL ()

اثر داروی آرتمتر بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده انگل لیشمانیا ماژور

آزمایش DNA خرد شده سلول‌های تیمار شده با آرتمتر

(*Schistosoma*)

[۲۲] (*Clonorchis*)

[۲۱] (*Fasciola*)

[۱۶] (*Malaria*)

(Xiao)

DNA

(Schistosomiasis)

DNA

Ladder

[۲۳]

(*Schistosoma japonicum*)

(*Schistosoma mansoni*)

(*Schistosoma haematobium*)

[۲۵-۲۳]

۴ ۳ ۲

DNA

DNA

۲۵

۱۰۵۰ ۹۰۰ ۸۰۰ ۳۰۰ ۱۲۰

DNA

(Trematode)

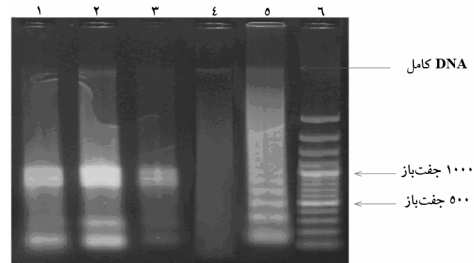
(۲)

(Triclabendazole)

(*Fasciola gigantica*)

(Shalaby)

(In vitro)



(In vivo)

(*Fasciola hepatica*)

[۲۶]

DNA

شکل ۲

۲۴

۱۰ ۲۵ ۵۰

Ladder (۴) (۳-۱)

(۶) DNA (۵)

[۲۷]

IC₅₀

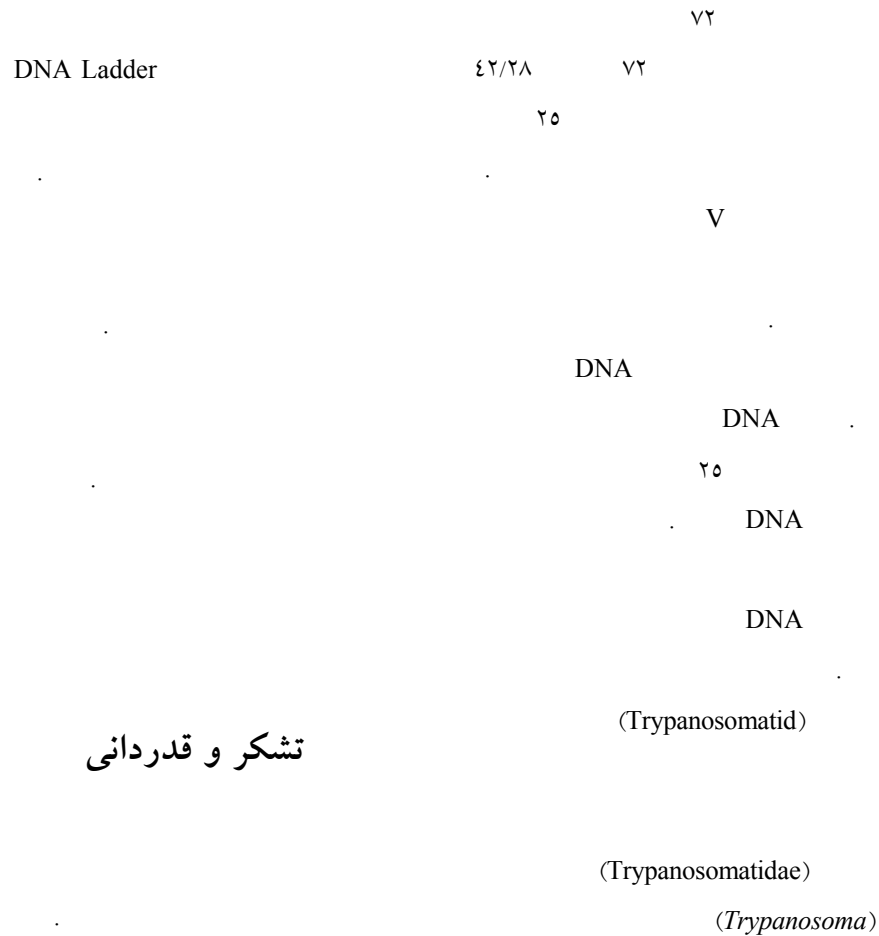
۲۵

۷۲

۵۰

بحث

[۲۸].



تشکر و قدردانی

منابع

- [1] Akhondzadeh S. Encyclopedia of Iranian Medicinal Plants. Tehran: Arjomand Press 2000; p: 199-209. (Persian)
- [2] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27(5): 305-18.
- [3] Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Horwith GS, Murray HW. Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. Ann Intern Med 1997; 127(2): 133-7.
- [4] Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology 1997; 114 Suppl: S91-9.
- [5] Soussi N, Milon G, Colle JH, Mougneau E, Glaichenhaus N, Goossens PL. Listeria monocytogenes as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen of Leishmania major. Infect Immun 2000; 68(3): 1498-506.
- [6] Mauël J. Vaccination against Leishmania

- infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2(3): 201-26.
- [7] Dietze R, Fagundes SM, Brito EF, Milan EP, Feitosa TF, Suassuna FA, Fonschiffrey G, Ksionski G, Dember J. Treatment of kala-azar in Brazil with Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(3): 309-11.
- [8] Das N, Mahato SB, Naskar K, Ghosh DK, Basu MK. Targeting of urea stibamine encapsulated in liposomes to reticulo-endothelial system for the treatment of experimental leishmaniasis. *Biochem Med Metab Biol* 1990; 43(2): 133-9.
- [9] Abahusein A, Larbi EB, al-Khawajah A, al-Gindan Y, Jain S. Evaluation of topical ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *East Afr Med J* 1992; 69(1): 14-7.
- [10] Méndez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol* 2001; 166(8): 5122-8.
- [11] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 564-82.
- [12] Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H, Croft SL: In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Trop* 2000; 77(3):307-314.
- [13] Berman JD, Ksionski G, Chapman WL, Waits VB, Hanson WL. Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(9): 1978-80.
- [14] Muñoz V, Moretti C, Sauvain M, Caron C, Porzel A, Massiot G, Richard B, Le Men-Olivier L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (syn. *Tabernaemontana van heurkii*). *Planta Med* 1994; 60(5): 455-9.
- [15] van Agtmael MA, Eggelte TA, van Boxtel CJ. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20(5): 199-205.
- [16] Falade C, Makanga M, Premji Z, Ortmann CE, Stockmeyer M, de Palacios PI. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine (Coartem) tablets (six-dose regimen) in African infants and children with acute, uncomplicated falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99(6): 459-67.
- [17] Chen T, Li M, Zhang R, Wang H. Dihydro-artemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy. *J Cell Mol Med* 2009; 13(7): 1358-70.
- [18] Chen H, Sun B, Pan S, Jiang H, Sun X. Dihydroartemisinin inhibits growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs* 2009; 20(2): 131-40.
- [19] Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol* 2006; 36(14): 1427-41.
- [20] Hamann A, Brust D, Osiewacz HD. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Trends Microbiol* 2008; 16(6): 276-83.
- [21] Keiser J, Rinaldi L, Veneziano V, Mezzino L, Tanner M, Utzinger J, Cringoli G. Efficacy and safety of artemether against a natural *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasitol Res* 2008;

- 103(3): 517-22.
- [22] Keiser J, Vargas M. Effect of artemether, artesunate, OZ78, praziquantel, and tri-bendimidine alone or in combination chemotherapy on the tegument of *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Int* 2010; 59(3): 472-6.
- [23] Xiao S, Utzinger J, Chollet J, Endriss Y, N'Goran EK, Tanner M. Effect of artemether against *Schistosoma haematobium* in experimentally infected hamsters. *Int J Parasitol* 2000; 30(9): 1001-6.
- [24] Xiao SH, Booth M, Tanner M. The prophylactic effects of artemether against *Schistosoma japonicum* infections. *Parasitol Today* 2000; 16(3): 122-6.
- [25] Shuhua X, Chollet J, Weiss NA, Bergquist RN, Tanner M. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int* 2000; 49(1): 19-24.
- [26] Shalaby HA, El Namaky AH, Kamel RO. In vitro effect of artemether and triclabendazole on adult *Fasciola gigantica*. *Vet Parasitol* 2009; 160(1-2): 76-82.
- [27] Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol* 2001; 17(3): 122-6.
- [28] Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3): 233-44.