فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A بر روی پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum* در شرایط آزمایشگاهی

محمدجواد ساکی[۱]، جاسم ساکی[۲]، رضا ارجمند[۱]

۱-گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲-مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

*نویسنده مسئول : جاسم ساکی نشانی برای مکاتبه: jasem.saki@gmail.com
دریافت مقاله: زمستان ۱۴۰۴ پذیرش برای چاپ: بهار ۱۴۰۵

چکیده

زمینه و هدف: *لیشمانیوز احشایی یک بیماری انگلی بالقوه کشنده است که درمان‌های موجود برای آن ممکن است با محدودیت‌هایی از جمله سمیت، شکست درمان، هزینه بالا و بروز مقاومت دارویی مواجه باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A بر روی پروماستیگوت‌های Leishmania infantum_ در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه فعالیت آن با مگلومین آنتیمونیات (Meglumine antimoniate) انجام شد.*

مواد و روش‌ها: *پروماستیگوت‌های L. infantum_ در مرحله سکون رشد (MCAN/IR/96/LON49) در معرض غلظت‌های مختلف ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۵/۵، ۱۷/۷۵، ۸/۸۷ و ۴/۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیب HESA-A قرار گرفتند. زنده‌مانی انگل با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی MTT پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه ارزیابی شد. غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC_{50}) با استفاده از تحلیل رگرسیون خطی برآورد گردید. تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های تحت درمان نیز با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد.*

یافته‌ها: *با افزایش مدت مواجهه پروماستیگوت‌های L. infantum با HESA-A از ۲۴ به ۷۲ ساعت، کاهش مقادیر IC_{50} مشاهده شد. مقادیر IC_{50} مربوط به HESA-A پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه به‌ترتیب ۱۵۰ ± ۲، ۳۵/۵ ± ۴ و ۸/۸۷ ± ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. مقادیر متناظر برای مگلومین آنتیمونیات (Meglumine antimoniate) به‌ترتیب ۱۰۰۰ ± ۲، ۵۰۰ ± ۳ و ۲۵۰ ± ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در شرایط آزمایشگاهی این مطالعه، مقادیر IC_{50} اندازه‌گیری‌شده برای HESA-A در هر سه زمان کمتر از مقادیر مربوط به مگلومین آنتیمونیات بود. بررسی میکروسکوپی نیز تغییراتی شامل چروکیدگی ظاهری و کاهش یا از دست رفتن تحرک پروماستیگوت‌های تیمارشده را نشان داد. این یافته‌ها به فرم پروماستیگوت انگل و شرایط آزمایشگاهی مطالعه محدود هستند.*

نتیجه‌گیری: *HESA- A در شرایط آزمایشگاهی موجب مهار پروماستیگوت‌های Leishmania infantum شد و مقادیر IC_{50} پایین‌تری نسبت به مگلومین آنتیمونیات نشان داد. این یافته‌های مقدماتی به فرم پروماستیگوت محدود بوده و تأیید ظرفیت درمانی HESA-A مستلزم مطالعات تکمیلی بر فرم آماستیگوت داخل‌سلولی، ارزیابی سمیت سلولی و بررسی‌های درون‌تنی است.*

واژگان کلیدی: *HESA-A؛ Leishmania infantum ؛ لیشمانیوز احشایی؛ فعالیت ضدلیشمانیایی؛ آزمون MTT؛ IC_{50}*

مقدمه

لیشمانیوز گروهی از بیماری‌های گرمسیری مغفول‌مانده است که توسط انگل‌های تک‌یاخته‌ای جنس *Leishmania_* ایجاد می‌شود. بسته به گونه انگل عامل بیماری و عوامل مرتبط با میزبان، بیماری می‌تواند به صورت لیشمانیوز جلدی، جلدی-مخاطی، جلدی منتشر یا لیشمانیوز احشایی تظاهر کند (۱). لیشمانیوز احشایی (Visceral Leishmaniasis؛ VL) شدیدترین شکل بالینی بیماری است و با تب طولانی‌مدت، کاهش وزن، بزرگی کبد و طحال، اختلالات

هماتولوژیک و سرکوب سیستم ایمنی مشخص می‌شود. در صورت عدم درمان، لیشمانیوز احشایی می‌تواند کشنده باشد(۱).

_*Leishmania infantum* یکی از عوامل مهم ایجادکننده لیشمانیوز احشایی در منطقه مدیترانه، خاورمیانه و بخش‌هایی از آسیای مرکزی، از جمله ایران، است(۲). این بیماری به‌ویژه در کودکان و افراد دچار نقص ایمنی اهمیت دارد. عفونت‌های ثانویه و سایر عوارض سیستمیک نیز ممکن است موجب افزایش بیماری‌زایی و مرگ‌ومیر در بیماران مبتلا شوند(۳).

درمان لیشمانیوز احشایی همچنان با چالش‌های متعددی همراه است. ترکیبات آنتیموان پنج‌ظرفیتی، از جمله مگلومین آنتیمونیات(Meglumine antimoniate) ، از گذشته برای درمان لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال، کاربرد آنها ممکن است به دلیل عوارض جانبی، طولانی بودن دوره درمان، اثربخشی متغیر و بروز مقاومت دارویی محدود شود(۴،۵). بنابراین، شناسایی و ارزیابی ترکیبات جدید ضدلیشمانیایی همچنان یکی از اولویت‌های مهم پژوهشی به شمار می‌رود.

ترکیبات طبیعی و مواد با منشأ زیستی توجه قابل‌توجهی را به عنوان منابع بالقوه عوامل ضدلیشمانیایی جدید به خود جلب کرده‌اند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برخی عصاره‌های گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی دارای فعالیت مهاری علیه گونه‌های مختلف _*Leishmania*، از جمله *L. infantum*، هستند(۶،۷). با این حال، میزان فعالیت مشاهده‌شده می‌تواند بسته به گونه و سویه انگل، ترکیب ماده مورد بررسی، شرایط آزمایشگاهی و روش مورد استفاده برای ارزیابی فعالیت متفاوت باشد.

HESA-A یک ترکیب گیاهی-دریایی ایرانی است که پیش از این از نظر برخی فعالیت‌های زیستی و دارویی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات تجربی، فعالیت ضدتکثیری HESA-A را علیه رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی انسانی گزارش کرده‌اند(۸). در مطالعات دیگری نیز اثرات زیستی این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی و مطالعات بالینی مورد ارزیابی قرار گرفته است(۹).

از نظر ارتباط مستقیم با موضوع مطالعه حاضر، در مطالعه قبلی ما مرگ سلولی شبه‌آپوپتوتیک در پروماستیگوت‌های *Leishmania major* پس از تیمار با HESA-A مشاهده شد. در آن مطالعه، مقدار IC_{50} مربوط به HESA-A پس از ۷۲ ساعت، ۲/۸۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که نشان‌دهنده ظرفیت بالقوه ضدلیشمانیایی این ترکیب است(۱۰). با این حال، اطلاعات موجود درباره فعالیت HESA-A علیه _ *L. infantum* محدود است.

بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A علیه پروماستیگوت‌های *L. infantum* در شرایط آزمایشگاهی، با استفاده از آزمون MTT، و مقایسه فعالیت مهاری آن با مگلومین آنتیمونیات Meglumine (antimoniate) انجام شد.

مواد و روش‌ها

طرح مطالعه

این مطالعه به‌صورت تجربی و برون‌تنی (in vitro) با هدف ارزیابی فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A علیه پروماستیگوت‌های _*Leishmania infantum* انجام شد. زنده‌مانی انگل پس از مواجهه با HESA-A با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی MTT تعیین گردید. مگلومین آنتیمونیات (Meglumine) antimoniate) به‌عنوان داروی ضدلیشمانیایی مرجع مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه HESA-A

HESA-A یک فرآورده زیستی با منشأ گیاهی-دریایی و مخلوطی از مواد حاصل از میگوی دریایی *Penaeus latisulcatus*، زیره سبز (*Carum carvi* L.) و کرفس (*Apium graveolens* L.)معرفی شده است. این دارو شامل ترکیبات معدنی و آلی نیزبوده و حاوی ترکیبات آمینوآنتراکینونی و همچنین مقدار کمی آب است(۱۱) .

HESA- Aمورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت دارویی اسوه تهیه شد. فرآورده مطابق روش آماده‌سازی مورد استفاده در این مطالعه با محلول بافر فسفات سالین (PBS) رقیق شد و برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز در آزمون فعالیت ضدلیشمانیایی به کار رفت.

. کشت پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum*

سویه *L. infantum* با کد MCAN/IR/96/LON49 در محیط کشت RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) که با ۲۵ میلی‌مولار HEPES (pH=7/2) ، ۱۵ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال‌شده با حرارت (FBS) ، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲ میلی‌مولار L-گلوتامین غنی‌سازی شده بود، مطابق روش‌های گزارش‌شده قبلی کشت داده شد (۱۲،۱۳).

کشت‌ها در دمای ۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و به‌صورت روزانه از نظر وجود آلودگی باکتریایی یا قارچی بررسی شدند. پروماستیگوت‌ها در مرحله سکون رشد (stationary phase) برداشت و سپس در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

آزمون رنگ‌سنجی MTT

فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ارزیابی شد.

به‌طور خلاصه، پروماستیگوت‌های موجود در مرحله سکون رشد، با غلظت ۱ × ۱۰^{۵} انگل در ۱۰۰ میکرولیتر تنظیم شده و در چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خانه توزیع شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از HESA-A با غلظت‌های مختلف ۳۰۰، ۱۵۰ ،۷۵، ۳۵/۵، ۱۷/۷۵، ۸۷ /۸ و ۴/۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌های حاوی پروماستیگوت‌ها اضافه شد.

اثر HESA-A پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه ارزیابی شد. چاهک‌های حاوی پروماستیگوت‌های بدون تیمار به‌عنوان کنترل منفی و چاهک‌های تیمارشده با مگلومین آنتیمونیات (Meglumine antimoniate) به‌عنوان کنترل داروی مرجع در نظر گرفته شدند. همچنین، چاهک‌های شاهد مناسب (Blank) برای اصلاح زمینه نیز در آزمایش گنجانده شدند. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار فنی (technical replicates)انجام شدند؛ به این صورت که هر غلظت از HESA-Aدر سه چاهک مستقل بررسی شد.

در پایان هر دوره انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۱–۲۲ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO به هر چاهک افزوده شد تا کریستال‌های فورمازان حل شوند. پس از ۱۵ دقیقه زنده‌مانی پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum* پس از مواجهه با غلظت‌های مختلفHESA-A ، با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. پس از انجام مراحل آزمون، چگالی نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. درصد زنده‌مانی انگل‌ها بر اساس مقایسه چگالی نوری گروه‌های تیمارشده با گروه شاهد محاسبه شد و سپس درصد مهار رشد تعیین گردید. غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC_{50}) با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism و روش رگرسیون خطی، بر اساس رابطه بین غلظت HESA-A و درصد مهار رشد انگل، برآورد شد. همچنین، تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های تحت درمان با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و با گروه شاهد مقایسه شد.

ارزیابی مورفولوژیک

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های *L. infantum*_ پس از مواجهه با HESA-A در غلظت معادل IC_{50}، با استفاده از میکروسکوپ نوری بر اساس مشاهدات کیفی انجام شد و اندازه‌گیری کمی یا امتیازدهی عددی برای شدت تغییرات مورفولوژیک و میزان تحرک صورت نگرفت. تغییرات مورفولوژی سلولی و میزان تحرک انگل‌ها با موارد مشاهده‌شده در کشت‌های کنترل بدون تیمار مقایسه گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری

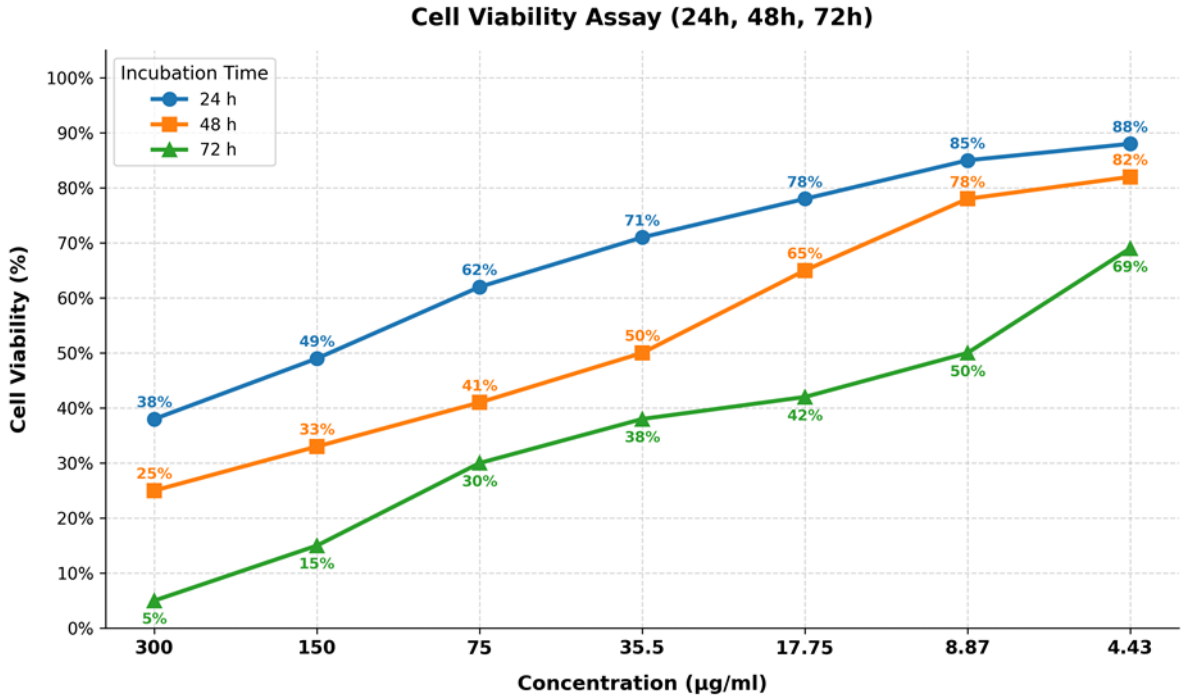
تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. مقادیر IC_{50} با استفاده از تحلیل رگرسیون خطی و بر اساس رابطه بین غلظت دارو و زنده‌مانی انگل برآورد شدند. مقدار P کمتر از ۰/۰۵از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A

در شرایط آزمایشگاهی این مطالعه، با افزایش مدت مواجهه پروماستیگوت‌های *L. infantum* با HESA-A از ۲۴ به ۷۲ ساعت، کاهش تدریجی مقادیر IC_{50} مشاهده شد. مقادیر IC_{50}این ترکیب پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه به‌ترتیب ۱۵۰ ± ۲، ۳۵/۵ ± ۴ و ۸/۸۷ ± ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۱).

شکل ۱. فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A علیه پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum* پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه. زنده‌مانی انگل‌ها با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد



این یافته نشان می‌دهد که در زمان‌های طولانی‌تر مواجهه، غلظت پایین‌تری از HESA-A برای دستیابی به مهار ۵۰ درصدی لازم بوده است. بااین‌حال، این تغییرات به‌تنهایی برای تعیین مکانیسم سینتیکی اثر این ترکیب کافی نیستند و تفسیر آن‌ها باید به تفاوت در مقادیر IC_{50} مشاهده‌شده در زمان‌های مختلف محدود شود.

در مقایسه، مقادیر IC_{50} متناظر برای مگلومین آنتیمونیات (Meglumine antimoniate) در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به‌ترتیب ۱۰۰۰ ± ۲، ۵۰۰ ± ۳ و ۲۵۰ ± ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

HESA-A در شرایط آزمایشگاهی موجب مهار پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum* شد. مقادیر IC_{50} این ترکیب در زمان‌های مواجهه بررسی‌شده کمتر از مقادیر متناظر مگلومین آنتیمونیات(Meglumine antimoniate) بود(جدول ۱).

جدول ۱. مقادیر IC_{50} مربوط به HESA-A و مگلومین آنتی‌موانیات در برابر پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum*.

مدت زمان مواجهه	IC_{50} HESA-A (µg/mL)	IC_{50}مگلومین آنتی‌مونیات(µg/mL)
۲۴ ساعت	۱۵۰ ± ۲	۱۰۰۰ ± ۲
۴۸ ساعت	۳۵/۵± ۴	۵۰۰ ± ۳
۷۲ ساعت	۸۷/۸ ± ۱	۲۵۰ ± ۴

تغییرات مورفولوژیک

بررسی میکروسکوپی پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum*تیمارشده باHESA-A ، تغییراتی در ظاهر و تحرک انگل‌ها را نشان داد. این تغییرات شامل کوچک‌شدن ظاهری سلول‌ها(shrinkage) ، کاهش تحرک (reduced motility) و در برخی موارد، از دست رفتن قابل مشاهده تحرک(loss of motility) بود. ارزیابی این تغییرات بر اساس مشاهدات کیفی با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد و اندازه‌گیری کمی یا امتیازدهی عددی برای شدت تغییرات مورفولوژیک و میزان تحرک صورت نگرفت. بنابراین، این یافته‌ها به‌عنوان مشاهدات توصیفی گزارش می‌شوند و به‌تنهایی برای اثبات مرگ انگل‌ها یا تعیین مکانیسم اثر HESA-A کافی نیستند.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که HESA-A در شرایط آزمایشگاهی دارای فعالیت ضدلیشمانیایی علیه پرومستیگوت‌های *L. infantum* است. اثر مهاری با افزایش مدت زمان مواجهه بیشتر شد؛ به‌طوری‌که IC_{50} از ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت، به ۳۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت و ۸/۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۷۲ ساعت کاهش یافت. تحت همان شرایط آزمایشی، مقادیر IC_{50} متناظر برای مگلومین آنتیمونیات (Meglumine antimoniate) به‌ترتیب ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

یافته‌های این مطالعه با بررسی قبلی ما درباره اثر HESA-A بر *L. major* مطابقت دارد. در آن مطالعه، HESA-A موجب مرگ سلولی شبه‌آپوپتوتیک در پرومستیگوت‌ها شد و IC_{50} آن پس از ۷۲ ساعت برابر با ۲/۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۱۰). مقدار بالاتر IC_{50} مشاهده‌شده در برابر *L. infantum* در مطالعه حاضر ممکن است ناشی از تفاوت میان گونه‌ها یا سویه‌های لیشمانیا، زیست‌شناسی انگل، حساسیت دارویی یا شرایط آزمایشی باشد. بااین‌حال، مقایسه مستقیم مقادیر IC_{50} بین مطالعات جداگانه باید با احتیاط انجام شود، زیرا تفاوت در سویه‌های انگل، شرایط کشت، روش‌های آزمون و فرآورده‌های دارویی می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر نتایج داشته باشد.

محصولات طبیعی متعددی پیش‌تر فعالیت ضد لیشمانیایی علیه *L. infantum* نشان داده‌اند. Bouyahya و همکاران فعالیت ضدلیشمانیایی عصاره‌های گیاهان دارویی شمال‌غرب مراکش را علیه *L. infantum* گزارش کردند که مقادیر IC_{50} بسته به نوع عصاره گیاهی متفاوت بود (۷). Eddaikra و همکاران نیز تفاوت‌هایی را در حساسیت *L. major* و *L. infantum* نسبت به عصاره‌های گیاهان دارویی الجزایری گزارش کردند (۱۳). این یافته‌ها از ادامه بررسی ترکیبات طبیعی و زیستی به‌عنوان منابع بالقوه عوامل ضدلیشمانیایی حمایت می‌کنند.

Molaie و همکاران اثرات آرتمیزینین، گلوکانتیم و عصاره غضروف کوسه را بر *L. infantum* بررسی کردند و اثرات مهاری متفاوتی را بسته به نوع درمان و شرایط آزمایشی گزارش کردند (۱۴). این یافته‌ها اهمیت ارزیابی ترکیبات کاندید با استفاده از آزمون‌های استاندارد و در صورت امکان، بررسی چندین مرحله از چرخه زندگی انگل را برجسته می‌کنند.

ترکیبات دیگری نیز علیه *L. infantum* مورد بررسی قرار گرفته‌اند. Khademvatan و همکاران فعالیت ضدلیشمانیایی میلته‌فوسین را علیه پرومستیگوت‌های یک سویه ایرانی *L. infantum* گزارش کردند (۱۵). بااین‌حال، متعاقباً مقاومت طبیعی به میلته‌فوسین در *L. infantum* گزارش شده است که بر چالش مداوم مقاومت دارویی در لیشمانیاز تأکید دارد (۱۶). اتینیل استرادیول نیز علیه اشکال پرومستیگوت و آماستیگوت *L. infantum* ارزیابی شده است که نشان‌دهنده طیف رویکردهای آزمایشی مورد استفاده در جست‌وجوی عوامل ضدلیشمانیایی جدید است(۱۷).

مکانیسم مسئول فعالیت HESA-A علیه *L. infantum* همچنان نامشخص است. مطالعه قبلی ما بر روی *L. major* نشان داد که پس از تیمار با HESA-A، مرگ سلولی شبه‌آپوپتوتیک رخ می‌دهد(۱۰). بااین‌حال، در مطالعه حاضر آپوپتوز به‌طور مستقیم بررسی نشد. بنابراین، تغییرات مورفولوژیک مشاهده‌شده در آزمایش‌های فعلی نباید به‌عنوان شواهد قطعی آپوپتوز تفسیر شوند.

مطالعه حاضر دارای چند محدودیت است. نخست، تنها مرحله پرومستیگوت *L. infantum* مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که مرحله داخل‌سلولی آماستیگوت از نظر بالینی اهمیت بیشتری دارد، مطالعات آینده باید HESA-A را علیه آماستیگوت‌های داخل‌سلولی در مدل‌های ماکروفاژی ارزیابی کنند. دوم، سمیت سلولی در سلول‌های پستانداران و شاخص انتخاب‌پذیری تعیین نشد. سوم، مکانیسم مولکولی مسئول فعالیت ضدلیشمانیایی مشاهده‌شده مورد بررسی قرار نگرفت. در نهایت، یافته‌های in vitro حاضر نمی‌توانند اثربخشی یا ایمنی بالینی را اثبات کنند.

با وجود این محدودیت‌ها، یافته‌های این مطالعه شواهد اولیه‌ای از فعالیت ضدلیشمانیایی HESA-A علیه پرومستیگوت‌های *L. infantum* ارائه می‌کنند. کاهش وابسته به زمان IC_{50} و تغییرات مورفولوژیک مشاهده‌شده پس از تیمار، انجام مطالعات بیشتر

درباره HESA-A را با استفاده از مدل‌های آزمایشی مرتبط‌تر با شرایط بالینی توجیه می‌کنند.

نتیجه‌گیری

در شرایط آزمایشگاهی، HESA-A موجب مهار پروماستیگوت‌های *Leishmania infantum*شد و مقادیر IC_{50} آن در زمان‌های مواجهه طولانی‌تر کاهش یافت. همچنین، در شرایط آزمایشی این مطالعه، مقادیر IC_{50} مربوط به HESA-A کمتر از مقادیر مشاهده‌شده برای مگلومین آنتیمونیات Meglumine (antimoniate) بود. بااین‌حال، ازآنجاکه این مطالعه صرفاً بر فرم پروماستیگوت انگل متمرکز بود، یافته‌های آن مقدماتی بوده و برای نتیجه‌گیری درباره اثربخشی درمانی HESA-A کافی نیستند. انجام مطالعات تکمیلی با استفاده از فرم آماستیگوت داخل‌سلولی، ارزیابی سمیت سلولی در سلول‌های پستانداران، تعیین شاخص انتخاب‌پذیری و بررسی در مدل‌های مناسب درون‌تنی ضروری است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه محمدجواد ساکی، دانشجوی پزشکی، انجام شد و توسط دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز (گرنت شماره CMRC-9635) حمایت مالی شد. نویسندگان از کارکنان گروه انگل‌شناسی پزشکی به‌خاطر همکاری و مساعدت آنان تشکر می‌کنند.

تأییدیه اخلاقی

این مطالعه شامل آزمایش‌های in vitro با استفاده از پرومستیگوت‌های *Leishmania infantum* بود و هیچ‌گونه مشارکت انسانی یا استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در آن انجام نشد. بنابراین، اخذ رضایت آگاهانه و تأییدیه اخلاقی مربوط به حیوانات کاربرد نداشت.

REFERENCE

1. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol. 2007; 5(11):873-882. doi:10.1038/nrmicro1748.
2. Mohebali M, Edrissian GH, Nadim A, Hajjaran H, Akhoundi B, Hooshmand B, et al. Application of direct agglutination test (DAT) for the diagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran. Iran J Parasitol. 2006; 1:15-25.
3. Karimi A, Alborzi I, Mahmoodi MR, Rakhshani AH, Kadivar MR. Short course anti-Leishmania therapy in children with visceral leishmaniasis. Iran J Med Sci. 1998; 23(1-2):6-10.
4. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. J Infect Chemother. 2004; 10(6):307-315. doi: 10.1007/s10156-004-0348-9.
5. Jha TK. Drug unresponsiveness and combination therapy for kala-azar. Indian J Med Res. 2006; 123(3):389-398.
6. Feily A, Saki J, Maraghi S, Moosavi Z, Khademvatan S, Siahpoosh A. In vitro activity of green tea extract against Leishmania major promastigotes. Int J Clin Pharmacol Ther. 2012; 50(3):233-236. doi:10.5414/CP201571.
7. Bouyahya A, Et-Touys A, Dakka N, Fellah H, Abrini J, Bakri Y. Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci. 2018;7(1):50-54. doi:10.1016/j.bjbas.2017.06.003.
8. Jahanban-Esfahlan R, Abasi M, Moghaddas Sani H, Mesgari Abbasi M, Akbarzadeh A. Anti-proliferative effects of Hesa-A on human cancer cells with different metastatic potential. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(16):6963-6966. doi:10.7314/APJCP.2015.16.16.6963.
9. Mesgari Abbasi M, Helli S, Monfaredan A, Jahanban-Esfahlan R. Hesa-A improves clinical outcome of oral carcinoma by affecting p53 gene expression in vivo. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(10):4169-4172. doi:10.7314/APJCP.2015.16.10.4169.
10. Saki J, Saki K, Arjmand R. Apoptosis-like cell death in Leishmania major treated with HESA-A: an herbal marine compound. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2021; 16(3):e99060. doi:10.5812/jjnpp.99060.
11. Moallem SA, Ahmadi A, Moshafi M, Taghavi MM. Teratogenic effects of HESA-A, a natural anticancer product from Iran, in mice. Hum Exp Toxicol. 2011;30:851-9.
12. Yousefi E, Eskandari A, Gharavi MJ, Khademvatan S. In vitro activity and cytotoxicity of Crocus sativus extract against Leishmania major (MRHO/IR/75/ER). Infect Disord Drug Targets. 2014; 14(1):56-60. doi:10.2174/1871526514666140827101901.
13. Eddaikra N, Boudjelal A, Sbabdji MA, Eddaikra A, Boudrissa A, Bouhenna MM, et al. Leishmanicidal and cytotoxic activity of Algerian medicinal plants on Leishmania major and Leishmania infantum. J Med Microbiol Infect Dis. 2019;7(3):66-71. doi:10.29252/JoMMID.7.3.66.
14. Molaie S, Ghaffarifar F, Hasan ZM, Dalimi A. Enhancement effect of shark cartilage extract on treatment of Leishmania infantum with Artemisinin and Glucantime and evaluation of killing factors and apoptosis in-vitro condition. Iran J Pharm Res. 2019; 18(2):887-902. doi:10.22037/ijpr.2019.1100656.

15. Khademvatan S, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Samadikuchaksaraei A, Oormazdi H, Mousavizadeh K, et al. Induction of apoptosis by miltefosine in Iranian strain of Leishmania infantum promastigotes. Iran J Parasitol. 2009; 4(2):23-31.
16. Carnielli JBT, Monti-Rocha R, Costa DL, Molina Sesana A, Pansini LNN, Segatto M, et al. Natural resistance of Leishmania infantum to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2019; 101(4):789-794. doi:10.4269/ajtmh.18-0949.
17. Shadnoush F, Arjmand R, Rahim F, Saki J. Study of ethinyl estradiol activity against promastigotes, axenic and macrophage-dwelling amastigotes of Leishmania infantum by using atomic force microscopy and methyl thiazolyl tetrazolium methods. Jundishapur J Microbiol. 2019; 12(8):e90857. doi:10.5812/jjm.90857.