

بررسی متابونومیکس اثر داروی آرتمیزینین روی فاز ایستائی انگل لیشمانیا ماژور سویه فردلین در شرایط آزمایش گاهی

مسعود بیگی بروجنی^۱ (M.Sc)، محمد ارجمند^{۲*} (Ph.D)، قادر خلیلی^۳ (Ph.D)، زیبا اکبری^۱ (M.Sc)، علی نجفی^۳ (M.Sc)، نسیم بیگی بروجنی^۴ (Ph.D)، افسانه شفیعی^۱ (M.Sc)، رضا حاجی حسینی^۱ (Ph.D)

۱- دانشگاه پیام نور تهران شرق، گروه بیوشیمی

۲- انستیتو پاستور تهران، گروه بیوشیمی

۳- انستیتو پاستور تهران، گروه ایمونولوژی

۴- دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی

چکیده

سابقه و هدف: بر اساس تقسیم‌بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO)، بیماری لیشمانیازیس از جمله شش بیماری مهم منطقه حاره‌ای محسوب می‌گردد. هم‌چنین این بیماری در خاورمیانه و کشورهای مدیترانه‌ای نیز شایع می‌باشد. اهمیت کنترل این بیماری، به دلیل افزایش موارد مشاهده شده در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی از جمله ایدز می‌باشد و با توجه به نیاز مبرم به داروهای جدید با عوارض کم‌تر برای کنترل و درمان بیماری، تاثیر داروی آرتمیزینین بر روی متابولیت‌های پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور (سوش فردلین) در شرایط آزمایش گاهی در انستیتو پاستور ایران بررسی گردید. مواد و روش‌ها: پس از تعیین IC50 داروی آرتمیزینین بر روی انگل لیشمانیا؛ متابولیت‌های انگل در دو گروه کنترل (بدون دریافت دارو) و گروه مورد آزمایش (دریافت‌کننده دوز مشخص از دارو) با استفاده از روش طیف‌سنجی مغناطیس هسته H NMR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که تغییرات متابولیسم فاز ایستایی پروماستیگوت لیشمانیا سوش فردلین در دو گروه کنترل و گروه تحت اثر داروی آرتمیزینین، از بین ۴۱ متابولیت چرخه متابولیسمی گالاکتوز، تعداد ۵ متابولیت بیش‌ترین تغییرات را نشان دادند، لذا متابولیت‌های مسیر گالاکتوز رتبه اول تغییرات را دارد و سپس متابولیت‌های مسیر بیوسنتز اسفنگولیپید و بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین در درجه بعدی اهمیت قرار می‌گیرند. نتیجه‌گیری: داروی آرتمیزینین در شرایط آزمایش گاهی با تغییر در متابولیت‌های مربوط به چرخه‌های متابولیسمی مختلف از جمله مسیر متابولیسمی گالاکتوز، مسیر بیوسنتز اسفنگولیپید و هم‌چنین مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین منجر به توقف فعالیت انگل لیشمانیا ماژور سویه فردلین گردید. طیف‌های حاصله از آزمون H NMR توسط نرم‌افزار آماری کموتریکس، اختلاف معنی‌داری را بین متابولیت‌های گروه دریافت‌کننده داروی آرتمیزینین و گروه بدون دریافت دارو نشان داد. با بررسی این تغییرات و شناسایی جایگاه متابولیت‌های مذکور در مسیرهای متابولیکی تغییر یافته می‌توان جهت از بین بردن انگل در جستجوی هدف‌دار ژن‌های موثر در بیان آنزیمی این مسیرها بود که برای انگل ضروری هستند و کنترل متابولیکی بالایی را در انگل انجام داده در حالی که کنترل کمی در میزبان دارند. با توجه به اهمیت درمان بیماری لیشمانیوز و نتایج مطالعه حاضر از مسیرهای متابولیسمی تغییر یافته در انگل لیشمانیا، با تمرکز بیش‌تر روی این مسیرها راهی برای بررسی‌های آتی بیماری و کشف داروها و درمان‌های جدید باز می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آرتمیزینین لیشمانیا، فردلین، متابونومیکس، متابولومیکس

مقدمه

جنس لوترومیا و فلیوتوموس منتقل می‌گردد. عامل بیماری لیشمانیازیس بر حسب محیط زندگی خود به دو شکل دیده می‌شود، پروماستیگوت (Promastigote) که زندگی خارج

بیماری لیشمانیازیس یکی از شش بیماری مهم نواحی حاره‌ای است [۱]. این بیماری، توسط ناقل پشه خاکی ماده از

الفابی محیطی یا خاص مرحله‌ای در متابولیسم لیشمانیا و سایر تریپانوزوماتیدها مناسب هستند [۱۰]. علم جدید متابولومیکس با کمک تکنیک‌های اسپکتروسکوپی NMR تعیین پروفایل متابولوم پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسینیک گونه‌های متفاوت لیشمانیا امکان‌پذیر می‌سازد. این روش جهت نقشه متابولیتی گونه‌های پروماستیگوت‌های لیشمانیا دونوانی به‌کار گرفته شده و می‌تواند برای شناسایی گونه‌های دیگر نیز روش مناسبی باشد [۱۲]. بنابراین متابونومیکس در برنامه‌های کشف دارویی یکی از مهم‌ترین اهداف و از فن‌آوری‌های جدیدی می‌باشد که امکان انتخاب صحیح در مصرف داروها را می‌دهد و باعث صرفه‌جویی و ترویج ایمنی می‌گردد [۱۱].

با شناسایی جایگاه متابولیت‌ها در مسیرهای متابولیکی، حذف هدف‌دار زن‌های مؤثر در بیان آنزیمی مسیرها، دست‌کاری جایگاه‌های فعال آنزیم و یا هدف قرار دادن آنزیم‌های منحصر به فرد مؤثر در این مسیرها می‌توانیم به اهداف دارویی جدید و روش‌های درمانی مفیدتر دست یابیم. برای از بین بردن یک انگل، باید در جستجوی یک آنزیم یا مسیر متابولیکی بود که برای انگل ضروری بوده ولی در میزبان وجود نداشته باشد [۱۸].

در مطالعه حاضر با توجه به این‌که اثر داروی آرتیمیزینین بر روی فاز ایستایی انگل لیشمانیا سوش فردلین بر روی فاز ایستایی انگل لیشمانیا در شرایط آزمایش‌گاهی ناشناخته است، با بررسی حاضر به نحوه تأثیر این دارو و تغییرات حاصل در مسیرهای مختلف متابولیسمی خواهیم پرداخت.

مواد و روش‌ها

پس از تهیه نمونه‌های انگل لیشمانیا سوش فردلین از حاشیه زخم موش BALB/c آلوده به این سوش، ابتدا جهت سازگاری انگل خارج شده از محیط بدن موجود زنده با محیط کشت، انگل‌ها در محیط جامد Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) کشت‌داده می‌شوند و سپس به محیط کشت مایع RPMI1640 غنی شده با ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی و ۲۰۰۰-۵۰۰ واحد پنی‌سیلین/استرپتومایسین انتقال و در شرایط استریل کشت داده می‌شوند. تا انگل به اندازه کافی رشد کند سپس انگل به تعداد 2×10^6 میلی‌لیتر در محیط مایع کشت داده می‌شود.

در طی یک هفته کشت انگل با شمارش تعداد انگل‌ها با استفاده از لام نوبار، نموداری از تعداد انگل در واحد زمان در روزهای کشت تهیه می‌گردد و به این ترتیب مرحله ایستایی انگل در روز ششم کشت که بهترین زمان جهت اضافه نمودن

سلولی را در دستگاه گوارش پشه خاکی فلیوتوموس طی می‌کند [۱-۳] و آماستیگوت (Amastigote) که زندگی داخل سلولی اجباری را در سلول‌های رتیکولاندوتلیال پوست و احشاء انسان و حیوانات مهره‌دار سپری می‌کند [۲]. مقاومت دارویی ایجاد شده در مقابل آلودگی لیشمانیا با درمان‌های دارویی مرسوم گزارش شده است [۳، ۴]. از این رو ضرورت جایگزینی داروهای دیگر با تشخیص مسیرهای متابولیکی تحت تأثیر دارو امری مهم و مورد توجه است [۵].

آرتیمیزینین یک ترین لاکتون جدا شده از گیاه درمنه آنوا است که، به عنوان داروی ضد مالاریا و ضد لیشمانیا شناخته شده است [۵]. بمپ‌های کلسیم در انگل لیشمانیا نیز به عنوان هدف دارویی قرار دارند [۶]. در مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف لیشمانیا فعالیت آنتی‌لیشمانیایی عصاره اتانولی برگ درمنه مورد بررسی و میزان IC50 اندازه‌گیری شده است [۵]. تا کنون مطالعات مختلفی در زمینه کاربرد داروی آرتیمیزینین و القاء آپوپتوز در پروماستیگوت لیشمانیا دونوانی و هم‌چنین در مورد لیشمانیوز جلدی صورت گرفته است [۵-۷]. در مطالعه دیگر تأثیر داروی آرتیمیزینین بر رشد انگل لیشمانیا ماژور و مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ناشی از آن بر پروماستیگوت و آماستیگوت‌های لیشمانیا در شرایط آزمایش‌گاهی بررسی و IC50 دارو تعیین شد. در این تحقیق برای به‌دست آوردن اثر سمیت داروی آرتیمیزینین روی انگل نیز از روش MIT استفاده شد [۵]. فعالیت آرتیمیزینین علیه لیشمانیا ماژور، توکسوپلازما گوندی و پنوموسیستیس کارینی در شرایط آزمایش‌گاهی نیز مشاهده شده است [۶]. بسیاری از مطالعات انجام گرفته بر روی پروماستیگوت نشان می‌دهد که سوخت و ساز گونه‌های لیشمانیای جدا شده لزوماً یکسان نیست [۷]. مطالعات بر روی پروماستیگوت‌های کشت داده شده در طی سه دهه اخیر دیدی کلی در مورد ظرفیت متابولیکی این انگل و نیازهای خاص تغذیه‌ای آن‌ها را نشان می‌دهد. هم‌چنین ما را به تعیین مسیرهای متابولیکی متعدد در یوکاریوت‌های متنوع از نظر تکامل که از سلول‌های میزبان به طور ذاتی متفاوت هستند، رهنمون می‌سازد [۸]. گسترش یک مدل قابل دسترس و قابل اطمینان و به دقت امتحان شده از شبکه‌های متابولیکی لیشمانیا جهت تسهیل آنالیز سیستم‌ها به اندازه اهداف دارویی جدید برای این پاتوژن مهم انسانی مورد نیاز است [۹]. با وجود کاربردهای وسیع متابولومیکس در آنالیز متابولیسم بعضی حیوانات و سیستم‌های میکروبی [۱۰، ۱۱] تجربیات کمی در مورد جایگاه استفاده از آن در آنالیز متابولیسم پاتوژن‌های میکروبی وجود دارد [۱۰]. دست‌آوردهای متابولومیک احتمالاً جهت ردیابی تغییرات

۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ و با جداسازی مایع رویی نمونه‌ها لیوفیلیزه می‌گردند.

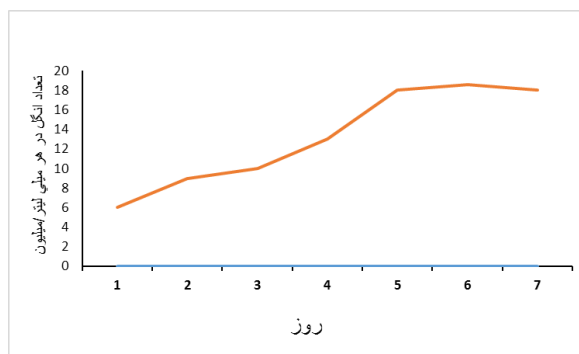
جهت انجام طیف سنجی مغناطیسی هسته ($^1\text{H-NMR}$) ابتدا به نمونه‌های لیوفیلیزه (1×10^9 سلول در هر ویال) ۲۰۰ میکرولیتر D_2O به ازای هر ۳۰۰ میلیون سلول انگل همراه با ۰/۰۰۰۴ گرم TSP افزوده می‌گردد و نمونه‌ها به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در دور ۴۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ و با رساندن اسیدیته محلول به میزان ۶،۸ با پرتکل NEOSY طیف‌گیری می‌گردند. پیک آب در محل جابه‌جائی شیمیائی ۴،۷۵ حذف و کل طیف به تعداد ۱۶۴۵ باکت تقسیم می‌گردد. طیف‌ها نرمالیز شده و اینتگرال پهنای زیر هر پیک توسط کد محاسباتی پرومب ثبت می‌گردند. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آماری کموتریکس و استفاده از آنالیز PCA و PLS-DA و با کمک نرم‌افزارهای متلب و پایگاه‌های متابولیت انجام می‌گیرد. نرم‌افزار متلب یک فضای پایه آماری می‌باشد و طیف‌های حاصل از آزمون $^1\text{H-NMR}$ در برنامه پرومب داده‌های معنی‌دار به صورت ماتریس‌های پیچیده را ارائه می‌دهد و در نهایت با استفاده از برنامه PCA و PLS-DA داده‌های حاصل مورد آنالیز قرار می‌گیرند. با رجوع به پایگاه اطلاعات متابولوم انسانی تغییرات موجود در جابه‌جائی شیمیائی پیک‌های متفاوت در دو گروه را مورد مقایسه قرار داده و متابولیت‌ها و مسیرهای بیوشیمیایی آن‌ها مشخص می‌گردند.

نتایج

نتایج آنالیز مطالعه حاضر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در فاز ایستایی پروماستیگوت بین متابولیت‌های گروه کنترل و آزمایش در مسیرهای بیوشیمیایی مختلف بودند. این تغییرات عمدتاً در مسیرهای متابولیسمی گالاکتوز، مسیر متابولیسم نشاسته و سوکروز، متابولیسم اسفنگولیپیدها، بیوسنتز اسیدهای آمینه والین، لوسین و ایزولوسین، مسیر متابولیسم بیوتین رخ داده است. در هر مسیر متابولیسمی به تعداد متابولیت‌های تغییر یافته (Hits) از میان تعداد کل متابولیت‌ها (Total) اشاره گردیده است، به طوری که بیش‌ترین تغییر و تأثیر مربوط به متابولیسم گالاکتوز (ضریب تأثیر ۰/۱۱)، متابولیسم اسفنگولیپیدها (ضریب تأثیر ۰/۲۳)، متابولیسم سوکروز و نشاسته (ضریب تأثیر ۰/۰۷) و مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین (ضریب تأثیر ۰/۰۱) می‌باشد.

در مسیر بیوشیمیایی متابولیسم گالاکتوز در متابولیت‌های آلفادیکلوکز ۶ فسفات، ملیبیوز، رافینوز، لاکتوز و استاکیوز تغییر اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و آزمایش نشان دادند.

داروی آرتیمیزینین به محیط کشت انگل می‌باشد تعیین می‌گردد.



شکل ۱. جدا سازی دو فاز ایستایی و لگاریتمی بر اساس منحنی رشد انگل

سلول‌های فاز ایستایی به دو گروه تقسیم می‌شوند و تحت عنوان گروه کنترل (بدون دریافت دارو) و گروه آزمایش (دریافت‌کننده داروی آرتیمیزین) در نظر گرفته می‌شوند. پس از استفاده از غلظت‌های مختلف دارو IC_{50} تعیین می‌گردد. گروه آزمایش با دوز ۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ازای هر سیصد هزار سلول با داروی آرتیمیزینین و گروه کنترل بدون دریافت دارو به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند. پس از گذشت این زمان نمونه‌ها در هر دو گروه به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ و با دور ریختن محیط رویی شستشو داده می‌شوند. پس از تکرار شستشو و آماده‌سازی نمونه‌ها، جهت حفظ و ثبوت نمونه‌ها، در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و فریز می‌شوند.

جهت استخراج متابولیت‌های سلولی انگل، ابتدا نمونه‌های فریز شده تا دمای صفر درجه سانتی‌گراد ذوب و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌شوند، سپس مایع رویی را دور ریخته و با شستشوی مجدد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ انجام و با تکرار سانتریفوژ نمونه خالص‌سازی می‌گردد.

جهت متلاشی‌سازی سلول و استخراج متابولیت‌ها نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد ورتکس و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سونیکیت می‌شوند. بعد از متلاشی‌سازی به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ انجام می‌گیرد و به دنبال خروج مایع رویی با افزودن اسید پرکلریک و جداسازی مایع رویی، محلول هیدروکسید پتاسیم ۵/۴ مولار را جهت ایجاد محیط با اسیدیته ۶/۸ به محیط اضافه می‌نماییم. در این مرحله نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت جهت رسوب کلرات پتاسیم و جداسازی از مایع روی یخ قرار می‌گیرند. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در

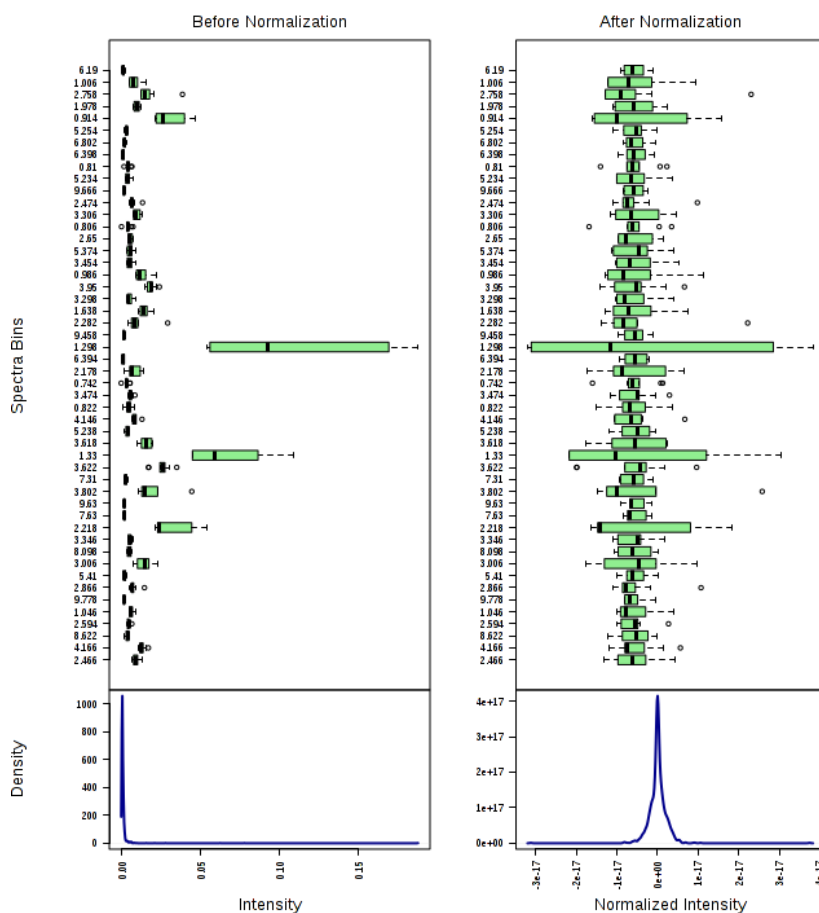
در مسیرهای بیوسنتز والین، لوسین، ایزولوسین متابولیت ترئونین اختلاف معنی دار بین متابولیت‌های گروه کنترل و آزمایش اشاره داشت.

در مسیر متابولیسم بیوتین در فاز ایستائی پروماستیگوت به تغییر معنی دار متابولیت‌های پیملات و ۶ کربوکسی هگزانول کوآ اختلاف معنی دار بین دو گروه کنترل و آزمایش را نشان دادند.

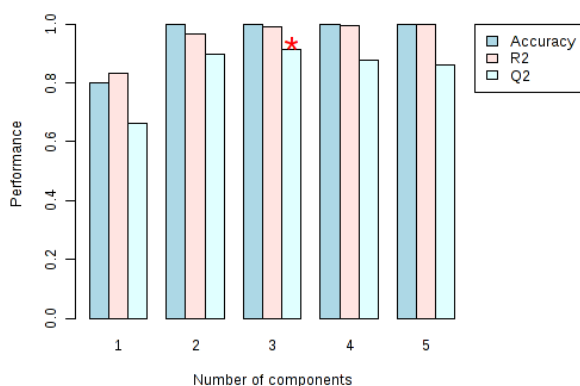
در مسیر متابولیسمی نشاسته و سوکروز، آمیلاز و آلفا دی گلوکز-۶-فسفات در فاز ایستائی پروماستیگوت اختلاف معنی دار بین متابولیت‌های گروه کنترل و آزمایش نشان دادند. در متابولیسم اسفنگولیپیدها، اسفنگوزین و اسفنگائین اختلاف معنی دار در دو گروه کنترل و آزمایش نشان دادند.

جدول ۱. مسیرهای متابولیتی تغییر یافته

تأثیر	نرخ اشتباه	عدد Holm	-log(p)	P خام	تعداد تغییر یافته	قابل انتظار	تعداد متابولیت	مسیرها
0.11	3.78E-01	7.46E-01	4.66E+00	9.44E-03	5	1.33	41	متابولیسم گالاکتوز
0.07	1.00E+00	1.00E+00	2.57E+00	7.64E-02	4	1.62	50	متابولیسم نشاسته و ساکاروز
0.23	1.00E+00	1.00E+00	1.64E+00	1.93E-01	2	0.81	25	متابولیسم اسفینگولیپید
0.01	1.00E+00	1.00E+00	1.53E+00	2.17E-01	2	0.87	27	بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین
0.00	1.00E+00	1.00E+00	1.19E+00	3.04E-01	1	0.36	11	متابولیسم بیوتین



شکل ۲. داده های بدست آمده از طیف های نمونه قبل و بعد از نرمال سازی داده ها بعد از نرمال سازی و جایجایی شیمیایی متابولیت هایی که با هم اختلاف دارند با استفاده از کد محاسباتی PCA آنالیز و مشخص گردیدند.

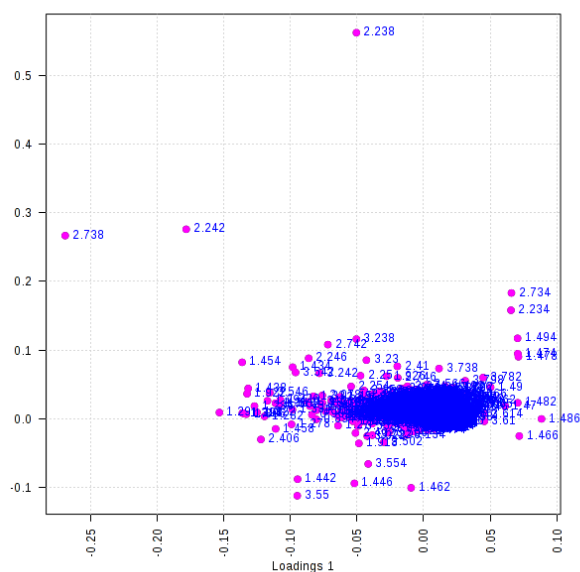


شکل ۵. جدا سازی دو گروه بر اساس بعد های PLS_DA و صحت و همچنین تست میزان مثبت و منفی کاذب. $P < 0.05$

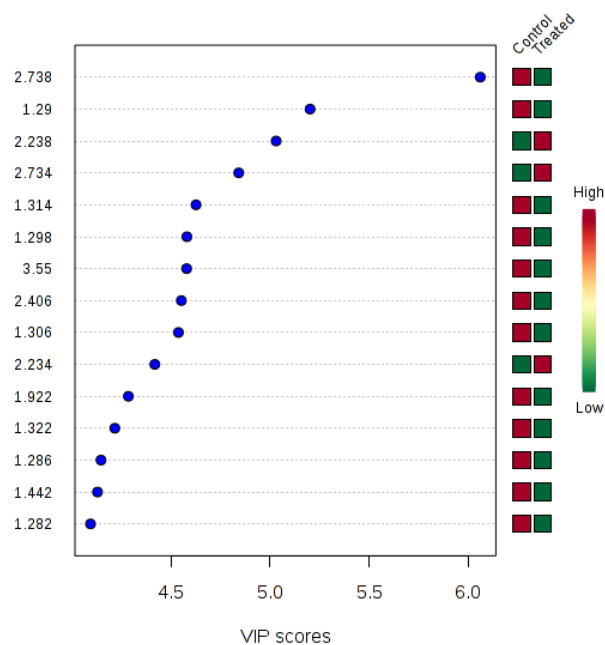
بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در فاز ایستایی پروماستیگوت بین متابولیت‌های گروه کنترل و آزمایش در مسیرهای بیوشیمیایی مختلف بودند. این تغییرات عمدتاً در مسیرهای متابولیسمی گالاکتوز، مسیر متابولیسم نشاسته و سوکروز، متابولیسم اسفنگولیپیدها، بیوستز اسیدهای آمینه والین، لوسین و ایزولوسین، مسیر متابولیسم بیوتین رخ داده است. مطالعات بیوشیمیایی انجام شده توسط باربارا کلزکا و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مورد نقش گالاکتوفورانوز در غشای سلولی انگل و حضور در لیپوفسفوگلیکان و نقش آن در پاتوژنیز می‌تواند به عنوان یک هدف دارویی مهم در مسیر متابولیسم گالاکتوز در نظر گرفته شود [۱۳]. بنابراین با توجه به بررسی حاضر و نقص در مسیر سنتز گالاکتوز فسفوگلیکان‌های لیسمانیا و بیماری‌زایی فسفوگلیکان‌ها می‌توان به اهمیت سنتز گالاکتوز در بیماری‌زایی انگل پی برد. اسفنگولیپیدها نقش مهمی در آپوپتوز سلولی ایفا می‌نمایند. علاوه بر نقش ساختاری در غشاء سلولی، برخی از متابولیت‌ها، از جمله سرامیدها، اسفنگوزین و اسفنگوزین-۱-فسفات، مورد توجه قرار گرفته‌اند و به عنوان مولکول‌های سیگنالی فعال زیستی درگیر در تنظیم رشد سلول، تمایز، پیری، و آپوپتوز شناخته شده‌اند [۱۴].

طبق مطالعات قبلی و اهمیت این مسیر در آپوپتوز سلولی هم‌چنین نتایج آزمایش ما، دارو در این مسیر با تغییر متابولیت‌های اسفنگانین و اسفنگوزین تغییر ایجاد نموده است که نشان‌دهنده اثربخشی آرتیمیزین می‌باشد. اسیدهای آمینه والین، لوسین و ایزولوسین تغییر یافته در دو گروه کنترل و مورد آزمایش انگل تاثیر بسیار زیادی در تغییر فعالیت گلوکز انگل دارد. به عبارتی میزان سوخت و ساز انگل در این دو



شکل ۳. لودینگ پلات دسته بندی دو گروه کنترل و آزمایش. با حذف داده های با ارزش کمتر و بدون تغییر در معنی اصلی داده ها، تغییرات مشاهده شده به صورت لودینگ پلات مشاهده می گردند. جابجاییهای شیمیایی متابولیتها که بیشترین تغییرات را نسبت به مرکز پلات (نقطه صفر)



شکل ۴. جابجایی شیمیایی متابولیت ها در دو گروه کنترل و آزمایش نشان داده شده است. رنگ قرمز نشانگر افزایش در میزان متابولیت ها و رنگ سبز نشانگر کاهش در میزان متابولیت ها می باشد.

مطالعه ما مسیر هگزوکیناز و گلوکز-۶-فسفات ایزومراز از مسیرهای یاد شده تغییر نمودند که با مطالعات انجام شده روی تریپانوزوم‌های آفریقایی هم‌سانی دارد و جزء دو مسیر اصلی از مسیرهای مربوطه می‌باشند که با مصرف آرتیمیزینین دچار مشکل گردیده‌اند تغییرات متابولیتی در مسیرهای کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه دیده شد، نقص در مسیر سنتز گالاکتوز و مسیر سنتز نشاسته و سوکروز در ارتباط با مسیر گلیکولیز از لحاظ تامین انرژی برای انگل بسیار مهم می‌باشند. با توجه به نقش کربوکسیلازی، بیوتین در تولیدسازی اسیدهای چرب و یافته‌های جدید در مورد متابولیسم اسیدهای چرب نه تنها دیدگاه اساسی نسبت به پایه‌های ملکولی پاتوژن لیشمانیا ایجاد می‌نماید، بلکه اهداف دارویی جدید را نیز نمایان می‌سازد. آنزیم‌های درگیر در متابولیسم استرول و اسید چرب که در اهداف دارویی مهم در لیشمانیا و سایر کیتوپلاستیدها به کار می‌روند، شناسایی شده‌اند. مجموعه مشابهی از الانگازها در حال حاضر در ژنوم لیشمانیا مازور حضور دارند، که ممکن است علت تولید اسیدهای چرب بسیار طولانی در لیشمانیا را توضیح دهد. با این تفاسیر می‌توان از مسیر سنتز اسید چرب در لیشمانیا به عنوان یک هدف مهم دارویی مورد استفاده قرار گیرد. همان‌گونه که توضیح داده شد اکسیداسیون اسید چرب یک پروسه مهم در آماستیگوت می‌باشد. سنتز اسید چرب نوع دوم با استیل کوآ کربوکسیلاز و پروتئین حامل آسیل (ACP) و کتواسیل (ACP) سنتاز و کتوآسیل (ACP) ردوکتاز و ترانس ۲ انویل (ACP) ردوکتاز در حال حاضر در لیشمانیا موجود می‌باشد [۱۷]. مطابق تحقیقات انجام شده سنتز اسید چرب نیز یک هدف دارویی مهم در درمان لیشمانیوز می‌باشد که در آزمایش ما نیز تغییرات متابولیتی مشاهده گردیده است.

داروی آرتیمیزینین در شرایط آزمایش‌گاهی با تغییر در متابولیت‌های مربوط به چرخه‌های متابولیسمی مختلف از جمله مسیر متابولیسمی گالاکتوز، مسیر بیوسنتز اسفنگولیپید و هم‌چنین مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین منجر به توقف فعالیت انگل لیشمانیا مازور سویه فردلین گردید. با بررسی این تغییرات و شناسایی جایگاه متابولیت‌های مذکور در مسیرهای متابولیسمی تغییر یافته می‌توان جهت از بین بردن انگل در جستجوی هدف‌دار ژن‌های موثر در بیان آنزیمی این مسیرها بود که برای انگل ضروری هستند و کنترل متابولیسمی بالایی را در انگل انجام داده در حالی که کنترل کمی در میزبان دارند [۱۸].

تعداد کم دستگاه‌های طیف‌سنجی NMR در مراکز تحقیقاتی کشور با توجه به هزینه بالای دستگاه و فاصله

گروه تغییر یافته است. در مطالعات انجام گرفته در تریپانوزوماتیدها بر روی متابولیسم اسیدآمینه‌های شاخه‌دار توسط Ginger و همکاران در سال ۲۰۰۱، نقش متابولیسم این اسید آمینه به عنوان سوبستراهایی برای چرخه‌های TCA را نشان می‌دهد. ژن‌هایی که برای متابولیسم اسیدهای آمینه شاخه‌دار مورد نیازند (۲) -کتوآمینواسید دکربوکسیلاز شاخه‌دار و ۳- هیدروکسی -۳- متیل گلو تاریل کوالیاز (HMG) پپتیدهای عبوری ذخیره‌ای میتوکندریایی را کد می‌نمایند [۱۵]. مطالعات ما تغییر در دو متابولیت ال و الین و ال‌ترئونین در چرخه بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین را نشان می‌دهد و با توجه به نقش اساسی این اسیدهای آمینه در چرخه می‌توان اثربخشی آرتیمیزینین را مشاهده نمود.

طبق مطالعات انجام شده روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا انگل برای تولید انرژی نیاز به متابولیسم گلیکولیز و آمینواسیدها دارد. گلوکز و دیگر قندها هم‌چون فروکتوز و مانوز به دی اکسید کربن، آلانین و سوکسینات و استات تبدیل می‌گردند. آنزیم‌های مختلف درگیر در متابولیسم قندهای ۵ کربنه هم‌چون ریپوکیناز، ریپولوکیناز و زایلوکیناز در تریپانوزوما نشان می‌دهد که تریپانوزوما قادر به کاتابولیز قندها و از جمله قندهای ۶ کربنه موجود در خرطوم پشه خاکی می‌باشند. پروماستیگوت‌ها از قندها استفاده می‌نمایند و آماستیگوت‌ها در فاگوزوم‌ها از اسیدهای چرب و آمینواسیدها استفاده می‌نمایند و دسترسی کم‌تری به قندها دارند. باقی مانده‌های قندی برای گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها، لنگر گلیکوفسفولیپید و بیوسنتز پلی‌ساکاریدها نیاز به اگزوالوستات از مسیر گلوکونوژن دارند. آنزیم‌های ضروری گلوکونوژن و آنزیم‌های گلیکولیتیک هم‌چنین فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز و فروکتوز ۱و۶ بیس فسفاتاز و ژن‌های درگیر در گلیکوزیلاسیون و شکل‌گیری پروکاریوت‌ها ضروری می‌باشند [۱۲].

طبق مطالعات انجام شده روی تریپانوزوم‌های آفریقایی که فاقد چرخه کربس‌اند و از گلیکولیز به عنوان تنها منبع انرژی استفاده می‌نمایند. برای جلوگیری از تولید انرژی نیاز به سنتز مهارکننده‌های خاص از آنزیم‌های مسیر گلیکولیتیک دارند. بنابراین گلیکولیز منبع مهم انرژی برای انگل می‌باشد و آن را می‌تواند به عنوان یک هدف دارویی بسیار مهم در نظر گرفت. مسیر گلیکولیتیک شامل آنزیم‌های هگزوکیناز، گلوکز ۶ فسفات ایزومراز، فسفوفروکتوکیناز، آلدولاز، تریوز فسفات ایزومراز، گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز، فسفولیپید کیناز، گلیسرول ۳ فسفات دهیدروژناز، گلیسرول کیناز، فسفولیپید موتاز، انولاز و پیرووات کیناز می‌باشد [۱۶]. در

exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3731-3738.

[5] Isvand Heidari F, Ghaffarifar F, Dalimi AH, Mortazavi Dehkordi N, Ghasemi Nikoo S. In vitro study of the effect of artemisinin on promastigotes and amastigotes of leishmania major. *Modares J Med Sci Pathol* 2012; 15: 33-43.

[6] Kamchonwongpaisan S, Meshnick SR. The mode of action of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *Gen Pharmacol* 1996; 27: 587-592.

[7] Opperdoes FR, Coombs GH. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. *Trends Parasitol* 2007; 23: 149-158.

[8] Beverley SM. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 11-19.

[9] Doyle MA, MacRae JI, De Souza DP, Saunders EC, McConville MJ, Likić VA. LeishCyc: a biochemical pathways database for Leishmania major. *BMC Syst Biol* 2009; 3: 57.

[10] Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, et al. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 45-50.

[11] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Holmes, 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-1189.

[12] Myler PJ, Fasel N. Review of leishmania: after the genome. *Parasit Vectors* 2008; 1: 11.

[13] Kleczka B, Lamerz AC, van Zandbergen G, Wenzel A, Gerardy-Schahn R, Wiese M, Routier FH. Targeted gene deletion of Leishmania major UDP-galactopyranose mutase leads to attenuated virulence. *J Biol Chem* 2007; 282: 10498-10505.

[14] Bartke N, Hannun YA. Hannun, bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 2009; 50: S91-S96.

[15] Ginger ML, Chance ML, Sadler IH, Goad LJ. The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid Leishmania mexicana. *J Biol Chem* 2001; 276: 11674-11682.

[16] Chawla B, Madhubala R. Madhubala, drug targets in Leishmania. *J Parasit Dis* 2010; 34: 1-13.

[17] van Weelden SW, van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG. New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic Trypanosoma brucei, a cycle not operating as a cycle. *J Biol Chem* 2005; 280: 12451-12460.

[18] Kaur J, Tiwari R, Kumar A, Singh N. Bioinformatic analysis of leishmania donovani long - chain fatty acid - CoA Ligase as a novel drug target. *Mol Biol Int* 2011; 2011: 278051.

زمانی برای انجام طیف سنجی و هم‌چنین محدودیت در دسترسی به سایت‌های مرتبط با آنالیز داده‌های حاصل از بررسی‌های متابونومیکس از جمله چالش‌هایی است که در انجام مطالعه با آن روبرو بودیم. با توجه به اهمیت درمان بیماری و هم‌چنین وجود گیاه درمنه کوهی به عنوان منبع داروی آرتیمیزینین در کشور خودمان، بررسی ما بر روی متابولیت‌های انگل لیشمانیا راهی برای بررسی‌های آینده بیماری و مسیرهای متابولیسمی تغییر یافته در انگل لیشمانیا و هم‌چنین تمرکز بیش‌تر بر روی این مسیرها برای تاثیر داروهای مختلف روی انگل لیشمانیا روزه‌ای رو به آینده در کشف داروها و درمان‌های جدید می‌باشد.

تشکر و قدردانی

????????????????

????????????????

??????

منابع

[1] Vega López F, Hay R. Parasitic worms and protozoa. *Rook's Textbook of Dermatology*, Eighth Edition 2004; 1-44.

[2] Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, et al. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 174: 821-827.

[3] Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S, Gamarró F. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* 2006; 9: 26-39.

[4] Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in Leishmania mexicana involves

The metabonomic changes of *leishmania major* s promastigotes (*fredlin strain*) after in vitro artemisinin treatment at stationary phase

Masoud Beigi boroujeni (M.Sc)¹, Mohammad Arjmand (Ph.D)^{*2}, Gader Khalili (Ph.D)³, Ziba Akbari(M.Sc)², Ali Najafi (M.Sc)³, Nasim Beigi boroujeni (Ph.D)⁴, Afsaneh Shafiei (M.Sc)¹ and Reza Haji Hosseini (Ph.D)¹

1 – Dept. of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2 - Dept. of Biochemistry, Payame Noor University, Faculty of Tehran Branch of Tehran-Shargh, Tehran, Iran

3 - Dept. of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4 - Razi Herbal Medicine Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

(Received: 04 Jan 2014; Accepted: 24 Apr 2014)

Introduction: Based on WHO classifications, *leishmaniasis* enumerates as one of the six important diseases in the tropics. It is also common in the Middle East and the Mediterranean countries. Control of the disease is important due to increased clinical cases in immune-system deficiency patients. With regard to the increasing need to new drugs with lesser side effects for the control and treatment of the disease, we surveyed the *in vitro* effects of artemisinin on the promastigotes of *leishmania major* s metabolites in Pasteur institute of Iran.

Materials and Methods: After IC50 determination, the effects of different concentrations of artemisinin drug were assessed on the metabolites of *leishmania* in two groups ; the control group (without drug reception in culture media) and the case group (with drug reception in culture media), by using NMR technique.

Results: The results of this study indicate that in the metabolic changes in promastigotes of *leishmania major* (*fredlin strain*) at stationary phase, 5 metabolites of the 41 ones in the galactose metabolic cycle have shown significant changes. Therefore, galactose metabolism has changed the most, while sphingolipid, valine, leucine and isoleucine biosynthesis follow respectively.

Conclusion: Artemisinin resulted in metabolic changes in biochemical pathways including galactose, sphingolipids and also valine, lucine, isoleucine that culminated in cessation of *leishmania major*'s (*fredlin strain*) activity. Spectra derived from H NMR showed significant difference ($p < 0.05$) between metabolites of the drug received group and the non-drug received group. The identification of altered metabolic sites in these pathways could be used for the annihilation of the parasite. Thus, detecting the important genes for the parasite in these pathways, with high metabolic control over the parasite, but minimal control over the host, is needed. Considering the importance of leishmaniasis treatment and the present data about modified metabolism pathways, we could present a novel route for the future assessment of the disease, drug discovery and new treatment with more focus on these pathways.

Keywords: Artemisinin, Leishmania, parasite, *Fredlin*, Metabonomics

*Corresponding author. Fax: +98 21 66402770 Tel: +98 21 66402770
arjmand@pasteur.ac.ir

How to cite this article:

Beigi boroujeni M, Arjmand M, Khalili G, Akbari Z, Najafi A, Beigi boroujeni N, et al . The metabonomic changes of leishmania major, s promastigotes (fredlin strain) after in vitro artemisinin treatment at stationary phase. koomesh. 2014; 16 (1) :90-96

URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-2277-1&slc_lang=en&sid=1