

سمیت نوری و سلولی کمپلکس کلروفیل a - هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور

اعظم جعفری پاریزی^۱، آمنه سازگارنیا^{۲*}، پوران لایق^۳، امید رجبی^۴، حبیب ا. اسماعیلی^۵

۱- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲- دانشیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار گروه پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- استادیار گروه آمار زیستی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۶/۲۶

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۳

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز جلدی یکی از بیماریهای شایع در جهان و ایران است. از طرف دیگر فتوداینامیک تراپی یک روش درمانی جالب برای درمان سرطان می‌باشد. این شیوه درمانی بر پایه واکنشهای یک حساس کننده نوری در حضور مولکولهای اکسیژن با طول موج مناسبی از نور طراحی می‌شود. با توجه به محل ضایعه، عدم درگیری سیستمیک و ناکارآمد بودن درمانهای رایج، امروزه این درمان برای لیشمانیوز پوستی مورد توجه واقع شده است. در این مقاله کارایی درمان فتوداینامیک (PDT) بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور با استفاده از کلروفیل a به عنوان یک حساس کننده طبیعی گزارش می‌گردد.

مواد و روشها: مطالعه بر روی انگل لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER با استفاده از کمپلکس کلروفیل a - هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین انجام گردید. ابتدا میزان جذب رنگ دارو به وسیله پروماستیگوتهای در زمانهای انکوباسیون متفاوت با بررسی‌های فلئوریمتری ارزیابی شد. پس از آن سمیت کمپلکس کلروفیل a در غلظتهای مختلف، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون رنگ دارو با پروماستیگوتهای مورد بررسی قرار گرفت. سرانجام آزمایشات PDT با استفاده از ۳ دز نوری در غلظت ۱۰ میکرومولار از رنگ دارو انجام و تاثیر درمانها با تعیین درصد بقای انگل ۲۴ ساعت پس از درمان به روش MTS محاسبه شد. هر یک از آزمایشات حداقل ۳ بار تکرار گردید.

نتایج: با توجه به بررسی‌های فلئوریمتری زمان انکوباسیون پروماستیگوتها با رنگ دارو ۲۴ ساعت انتخاب گردید. IC50 کمپلکس کلروفیل a - سیکلودکسترین، ۴۲/۶ میکرومولار تعیین شد. درمان با دز نور ۲۴۸ ژول بر سانتی متر مربع باعث مرگ بیش از نیمی از پروماستیگوتهای گردید که از نظر آماری نسبت به گروههای مشابه بدون رنگ دارو، بدون نور و درمان با دز نور کمتر دارای تفاوت معنی دار بوده است. LD50 برای PDT تقریباً ۲۴۶ ژول بر سانتی متر مربع بدست آمد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به سمیت سلولی کم کمپلکس کلروفیل a - سیکلودکسترین در تاریکی و سمیت نوری کافی آن در مقایسه با حساس کننده‌های نوری دیگر نظیر آلومینیوم فتالوسیانین کلراید، این حساس کننده به عنوان یک کاندیدای امیدوار کننده برای آزمایشات PDT روی آماستیگوتهای و مدل‌های حیوانی مطرح می‌شود. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۸، شماره ۲، پیاپی (۳۱)، تابستان ۹۰: ۹-۱۸)

واژگان کلیدی: درمان فتوداینامیک، لیشمانیوز پوستی، کلروفیل a، هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین

* نویسنده مسؤل: آمنه سازگارنیا

آدرس: گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک

پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

sazgarniaa@mums.ac.ir

تلفن ۹۸ (۵۱۱) ۸۰۰۲۳۲۳+

۱- مقدمه

لیشمانیوز (سالک) یک موقعیت مطرح جهانی را در میان عوامل مرگ ناشی از بیماری‌های عفونی به خود اختصاص داده است [۱] و لیشمانیوز جلدی یک بیماری مهم و مورد توجه در بسیاری از قسمت‌های جهان، بویژه در منطقه مدیترانه، تعدادی از کشورهای آفریقایی و تقریباً همه کشورهای جنوب شرقی آسیا شامل ایران بشمار می‌رود [۲]. شیوه‌های درمانی رایج شامل تجویز سیستمیک داروهای ضد انگل نظیر سدیم استیگلوکونات^۱، مگلو مین آنتیمونات^۲، آفوترسین B^۳، ایزوتیونات پتامیدین^۴ است، که اغلب دردناک می‌باشند. درمان معمولاً طولانی مدت بوده و همراه با اثرات جانبی نظیر ضعف، بی‌اشتهایی و اختلالات عملکرد کبد و گاه توام با لکوپنی و ترومبوسیتوپنی در درمان طولانی مدت می‌باشد [۳]. ایجاد سمیت و مقاومت دارویی در شیمی‌درمانی لیشمانیوز [۴، ۵] موجب شده‌است استفاده از شیوه‌های فیزیکی مانند کرایوتراپی، ترموتراپی و در سالهای اخیر فتوداینامیک تراپی (PDT)^۵ به عنوان روش‌های جان‌نشین برای ریشه‌کن کردن لیشمانیوز جلدی مورد توجه قرار گیرد [۴]. از طرف دیگر عفونت‌های انگلی موضعی پوست می‌تواند یک مدل در دسترس، برای مطالعه امکان کاربرد PDT در درمان بیماری‌های انگلی پوست فراهم کند [۳، ۶]. به ویژه در ارتباط با لیشمانیوز پوستی با توجه به موقعیت محیطی ضایعه، عدم درگیری سیستمیک و ناکارآمد بودن درمان‌های موجود، PDT می‌تواند به عنوان یک شیوه درمانی مناسب مطرح شود [۳، ۷].

PDT شامل تجویز ترکیبات حساس به نور (حساس کننده) و تجمع آن در سلولهای هدف و به دنبال آن تحت تابش قرار دادن ضایعه با طول موجهای معینی از نور می‌باشد [۹، ۸]. اولین نسل از حساس کننده‌ها پورفیرین‌ها هستند [۱۱، ۱۰] که دارای مشکلاتی از قبیل پیچیدگی

شیمیایی [۱۲]، پایین بودن ضریب جذب نوری مولی، نگه داشته شدن توسط بافت سالم به مدت طولانی می‌باشند [۱۲-۱۴]. این عوامل موجب توسعه حساس کننده‌های نسل دوم یعنی مشتقات پورفیرین‌ها، شده است [۱۱] که در آنها کارایی جذب نور بیشتر و بهره تولید اکسیژن یگانه بالاتر است [۱۵]. اما بسیاری از حساس کننده‌های نسل دوم بشدت آب‌گریز بوده و سلکتیویته ضعیفی نسبت به تومور دارند [۱۶]. کلروفیل‌ها خانواده دیگری از حساس کننده‌ها با راندمان تحریک سه‌گانه بالا و زمان استحاله مشابه با مشتقات هماتوپورفیرین می‌باشند و فعالیت ضد توموری آنها بعد از حمل توسط میسل یا لیپوزوم به اثبات رسیده است [۱۷، ۱۱، ۱۰]. این ماده از بافتهای بدن موش در عرض چند روز پاک می‌شود که این زمان بسیار کوتاهتر از زمان لازم برای فتوفیرین است [۱۸]. در حال حاضر بیش از پنجاه نوع کلروفیل طبیعی شناخته شده‌است [۱۹]. از این میان کلروفیل a یکی از کاندیداهای مطلوب به عنوان حساس کننده نوری می‌باشد، زیرا به آسانی از گیاهان سبز تهیه شده و دارای ضریب خاموشی بالایی در ناحیه قرمز است [۲۰].

سیکلودکسترین‌ها^۱ (CDs) الیگومرهای سیکلیک^۶ مشتق شده از آمیلاز با تعداد متفاوتی از واحدهای α -1-4 متصل به واحدهای گلوکز [۱۳، ۲۱]، دارای سمیت بسیار کم و توانایی تشکیل کمپلکس با بسیاری از مواد طبیعی بوده و به طور گسترده‌ای به عنوان سیستم‌های حمل داروهای با حالیت کم در آب، در کاربردهای داروشناختی استفاده شده‌اند [۱۳، ۲۲]. کلروفیل a دارای ساختار آمفیفیلیک [۱۳] و غیر قابل حل در آب می‌باشد و تقریباً مانند همه کلروفیل‌های طبیعی دارای یک زنجیره طولانی استری-الکلی است. اصلی‌ترین محدودیت در استفاده از کلروفیل a ناشی از حالیت خیلی کم آن در آب و تمایل شدید به تشکیل توده می‌باشد [۲۱] که باعث تضعیف خواص فتوفیزیکی حساس

¹ Sodium Stibogluconate

² Meglumine Antimoniate

³ Amphotercin-B

⁴ Pentamidine Isothionate

⁵ Photodynamic Therapy

⁶ Cyclodextrins

⁷ Cyclic Oligomers

۲-۲- هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین

کمپلکس کلروفیل a با هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین، (سیگماآلدریج، آمریکا M.W: 1580; Cat No. 390704) که از این به بعد رنگ دارو نامیده می شود، در مرکز تحقیقات شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه [۲۲] و به منظور تعیین غلظت، طیف جذبی آن در آب مقطر دیونیزه در طول موجهای ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر ثبت گردید.

۳-۲- MTS^۲

پس از انجام درمانها روی پروماستیگوتها در گروههای مختلف بقای انگل به روش MTS (Cat No. G5421; پرومگا، آمریکا) با استفاده از سیستم الیزاریدر ساخت کمپانی آپرنس^۳ مدل ۳۲۰۰ در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

۴-۲- روش کار

در این تحقیق ابتدا اقدام به کسب دادههایی شد که از طریق آنها بتوان میزان ورود رنگدارو به پروماستیگوتها را ارزیابی نمود. در مراحل بعدی پس از تعیین زمان مناسب انکوباسیون و غلظت غیرسمی آن آزمایشات اصلی به منظور بررسی بازده درمانهای فتوداینامیک صورت پذیرفت.

۴-۱-۴- شرایط کشت پروماستیگوتها

انگل لیسمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER که از طریق پاساژ در بدن موش Balb/c حفظ و نگهداری می گردید، جهت انجام آزمایشات در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. پروماستیگوتها در محیط RPMI-1640 (HIMEDIA; AT 028)، حاوی ۱۰۰ واحد پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین در هر میلی لیتر به انضمام ۱۰ درصد FCS در انکوباتور ۲۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. به منظور پاساژ انگلها، ابتدا محیط کشت فلاسک را خارج کرده و هم حجم محیط باقی مانده به آن محیط کشت اضافه شد. فعالیت و رشد پروماستیگوتها منجر

کننده و کاهش بازده فتواکسیداتیو می گردد. تشکیل کمپلکس سیکلودکسترین با کلروفیل a، حلالیت پیگمان در محلولهای آبی را افزایش داده و تشکیل توده را تعدیل می سازد. همچنین زمان استحاله سه گانه آن در غیاب اکسیژن، طولانی و در حضور اکسیژن کوتاه می باشد که این دو مورد از خصوصیات یک حساس کننده خوب بشمار می روند [۲۲،۲۳].

با توجه به موارد فوق، در این مطالعه بررسی امکان درمان لیسمانیوز پوستی به روش فتوداینامیک با استفاده از کمپلکس کلروفیل a- هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین، با هدف دستیابی به یک شیوه درمانی مؤثر با عوارض جانبی کمتر مد نظر قرار گرفت و در گام اول تاثیر درمان بر پروماستیگوتهای لیسمانیا مطالعه گردید.

از آنجا که PDT در سالهای اخیر برای لیسمانیوز پوستی مطرح شده [۴]، گزارشات محدودی در این مورد وجود دارد، اما تا کنون مطالعه ای در زمینه درمان این بیماری به روش فتوداینامیک با استفاده از کلروفیل a گزارش نگردیده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- کلروفیل a

استخراج کلروفیل a از اسفناج توسط شرکت کیمیا کاوان انجام گردید. ابتدا برگهای تازه تهیه شده اسفناج در دمای اتاق کاملاً خشک آسیاب شد. پس از عصاره گیری از برگها، عصاره به دست آمده در شرایط خلاء و در دمای کمتر از ۵۰ درجه سانتیگراد تغلیظ گردید. این عصاره حاوی کلروفیلهای a و b و سایر ناخالصیها می باشد. برای جدا نمودن کلروفیل a از سایر ترکیبات از روش کروماتوگرافی ستون با فاز ثابت استفاده شد. پس از حذف حلالها با آزمون TLC^۱ و اسپکتروفتومتری فرابنفش از خلوص کلروفیل a اطمینان حاصل شد. غلظت کلروفیل a بر اساس بلندترین طول موج جذب آن در متانول (۶۷۰ نانومتر) تعیین گردید.

^۲ [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyltetrazolium bromide

^۳ AWARENESS

^۱ Thin Layer Chromatography

به تغییر رنگ محیط کشت از صورتی به زرد می‌گردد. انگل‌های پاساژ داده شده پس از ۶ روز نگهداری در انکوباتور آماده استفاده می‌باشند که در این مرحله در فاز ثابت رشد هستند [۲۴].

۲-۴-۲- آزمایشات فلوتوریمتری به منظور تعیین مدت زمان انکوباسیون

آزمایشات فلوتوریمتری شامل سه مرحله است. ابتدا طیف نشری فلوتورسانس حاصل از کمپلکس کلروفیل a-سیکلودکسترین ثبت و مناسبترین طول موج نشر کلروفیل a تعیین گردید. بدین منظور سه نمونه انتخاب شد. نمونه اول شامل انگل و کلروفیل a در محلول ۱۰ درصد SDS^۱، نمونه دوم شامل انگل بدون حضور کلروفیل a و نمونه سوم محلول ۱۰ درصد SDS بدون انگل و کلروفیل a که بعنوان شاهد اصلی مورد استفاده قرار گرفت. این بررسی به منظور اطمینان از عدم تاثیر محتویات ساختاری انگل بر طیف فلوتورسانس کلروفیل a صورت گرفت.

در مرحله بعد به منظور سنجش کمی کلروفیل a موجود در نمونه‌ها به روش فلوتوریمتری نیاز به رسم منحنی استاندارد کلروفیل a بود. بر همین اساس ابتدا کمپلکس کلروفیل a با غلظت ۱۶ میکرومولار در محلول ۱۰ درصد SDS تهیه شد و از آن غلظت‌های مختلف برای رسم منحنی استاندارد آماده گردید. طیف نشری نمونه‌ها به روش فلوتوریمتری با طول موج تحریک ۴۱۷ نانومتر و نشر ۶۷۲ نانومتر تعیین گردید. منحنی سطح سیگنال نشری بر حسب غلظت کلروفیل a رسم شد. داده‌های رسم منحنی با سه بار تکرار به دست آمد و نشر شاهد از آنها کسر گردید. پس از رسم منحنی استاندارد، شدت فلوتورسانس نمونه‌ها به غلظت کلروفیل a بر حسب میکرومولار تبدیل شد. در نهایت برای به دست آوردن مناسبترین زمان انکوباسیون پروماستیگوتها با کمپلکس کلروفیل a-سیکلودکسترین، سوسپانسیون انگل با تراکم 2×10^7 انگل بر میلی‌لیتر تهیه گردید و در لوله آزمایش با آن به مدت ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. بعد از اتمام

زمان انکوباسیون، به منظور خارج کردن رنگ داروی باقیمانده از محیط، شستشو با PBS^۲ انجام و به منظور پاره کردن غشاء انگل‌ها و خارج شدن محتوی آنها به رسوب باقیمانده میزان ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد SDS اضافه گردید. سپس طیف نشری فلوتورسانس انگل به روش فلوتوریمتری با طول موج تحریک ۴۱۷ نانومتر و نشر ۶۷۲ نانومتر بدست آمد. به موازات این کار درصد بقای پروماستیگوتها در هر نمونه به روش MTS تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد MTS تعداد سلولهای زنده در هر نمونه مورد محاسبه قرار گرفت.

۲-۴-۳- تعیین غلظت مناسب رنگ دارو برای انجام درمان سوسپانسیون پروماستیگوتها با تراکم 1×10^7 انگل بر میلی-لیتر تهیه و با غلظت‌های ۵۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ میکرومولار از کمپلکس به مدت ۲۴ ساعت در لوله آزمایش انکوبه شد. بعد از اتمام زمان انکوبه و شستشوی نمونه‌ها به منظور خارج کردن رنگ داروی اضافی، پروماستیگوتها به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند، به طوری که تعداد پروماستیگوت در هر چاهک 1×10^6 در ۲۰۰ میکرولیتر باشد. پس از آن میزان بقا با انجام تست MTS به دست آمد و غلظتی که در آن کمترین میزان مرگ برای پروماستیگوتها به دست آمد، انتخاب گردید و درمانهای بعدی با این غلظت از کمپلکس کلروفیل a انجام گرفت.

۲-۴-۴- درمانهای فتوداینامیک

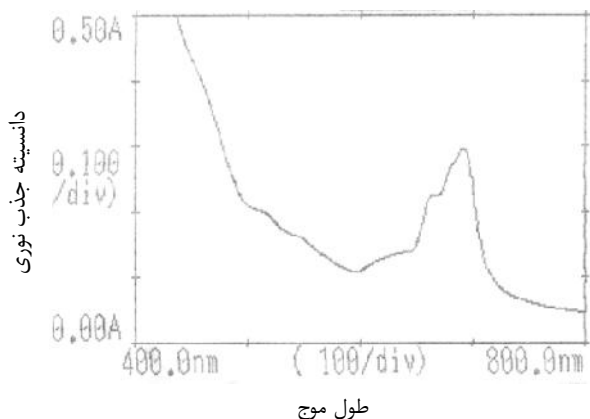
برای انجام درمانها چهار گروه موردنظر قرار گرفت: گروه اول به عنوان کنترل لحاظ گردید و در گروههای دوم تا چهارم ارزیابی آثار بترتیب نوردی به تنهایی در دزهای مختلف، رنگ‌دارو به تنهایی و تاثیر توأم نور و رنگ‌دارو بر بقا و تکثیر پروماستیگوتها مدنظر قرار گرفت. به منظور انجام درمانها سوسپانسیون انگل با غلظت 1×10^7 انگل بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس سوسپانسیون انگل در دو لوله آزمایش شامل کمپلکس کلروفیل a-سیکلودکسترین با غلظت 10^{-5} مولار (۱۰ میکرومولار) و بدون کمپلکس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در این مرحله از محیط

² Phosphate Buffered Saline

¹ Sodium Dodecyl Sulfate

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

پس از تعیین درصد بقای پروماستیگوت‌ها، داده‌ها توسط نرم افزار SPSS ۱۱/۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این بررسی آماری، ابتدا آزمون نرمالیتی^۳ روی داده‌ها انجام گرفت و در صورت نرمال نبودن توزیع داده‌ها از آزمونهای ناپارامتری کروسکال-واریس^۴ و من-ویتنی^۵، و برای داده‌های نرمال از آنالیز واریانس یک طرفه، آزمونهای توکی^۶ و تی تست^۷ برای مقایسه‌ی نتایج درمانی در گروههای مختلف بهره‌گیری شد.



نمودار ۱- طیف جذبی کمپلکس کلروفیل a- هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین در اب مقطر دیونیزه

۳- نتایج

۳-۱- طیف نشری فلئورسانس حاصل از کمپلکس

کلروفیل a- سیکلودکسترین

نمودار (۱) نشان دهنده طیف جذبی کمپلکس کلروفیل a با قله جذب در طول موج ۶۹۲ نانومتر می‌باشد. به منظور تعیین مناسبترین طول موج نشر کلروفیل a اقدام به بررسی طیف نشری آن در نمونه‌ها گردید. حاصل این بررسی در نمودار (۲) ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، قله نشر این ماده پس از تحریک در ۴۱۷ نانومتر در طول موج ۶۷۲ نانومتر ثبت شده است.

کشت حاوی ۵ درصد FCS استفاده شد تا ورود رنگ دارو به داخل انگل تسهیل شود. سپس کلیه نمونه‌ها با محیط کشت بدون FCS شستشو داده شدند و داروی اضافی از محیط خارج گردید. نوردهی گروه های ۲ و ۴ در پلیت های ۲۴ خانه استریل و با دزهای نوری ۱۲۴، ۱۹۸، ۲۴۸ ژول بر سانتی متر مربع انجام گرفت. پس از اتمام مراحل فوق 1×10^6 پروماستیگوت به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه استریل منتقل و بعد از ۲۴ ساعت به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر MTS اضافه گردید. سپس پلیت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از ۳ ساعت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط سیستم الیزایدی تعیین و درصد بقای انگل در نمونه‌های مذکور محاسبه گردید. محیط کشت مورد استفاده در مراحل نوردهی و انکوباسیون نهایی انگل‌ها حاوی ۱۰ درصد FCS بود تا شرایط مناسب برای رشد، بقا و تکثیر انگل‌ها فراهم آید. آزمایشات با سه بار تکرار و هر بار با ۶ چاهک حاوی نمونه صورت گرفت. از یک منبع نورانی غیر کوهرنر ساخت شرکت Luma Care آمریکا مدل LC-122 مجهز به رشته‌های نوری با قطر ۲ میلی‌متر و قطر لکه^۱ ۸ میلی‌متر جهت نوردهی نمونه‌ها استفاده گردید. قبل از آغاز نوردهی پروب 30 ± 670 نانومتر که مناسب با رنگ داروی مورد استفاده بود روی منبع نور نصب شد. به منظور اندازه‌گیری دانسیته‌ی توان و خروجی پروب نوری مورد استفاده در این تحقیق، از نورسنج CON-TROL-CURE IL 1400 ساخت شرکت آمریکایی UVPROCESS مجهز به آشکارساز نوری دارای پاسخ تحت ۲ استفاده شد. چگالی توان خروجی منبع نوری از فیبرهای اپتیکی در طول موج ۶۷۰ نانومتر، ۶۰ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع با همگنی ۵٪ \pm بوده است. نوردهی انگل‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه انجام شد و به منظور جلوگیری از تابش نور پراکنده از نمونه تحت نوردهی به سایر نمونه‌ها، هر نمونه به تنهایی نوردهی گردید.

³ Normality

⁴ Kruskal-Wallis

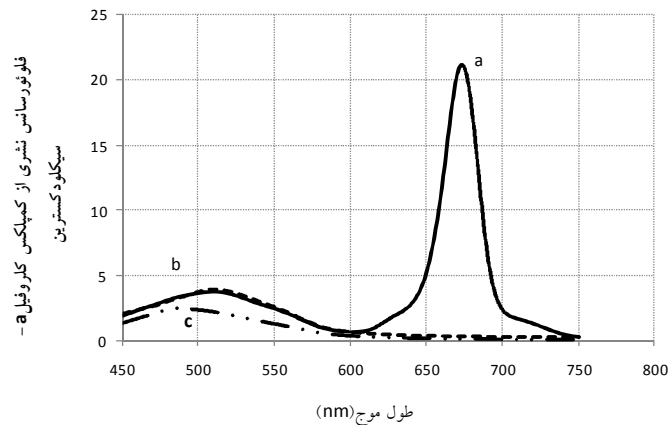
⁵ Man-Whitney

⁶ Tukey

⁷ T-test

¹ Spot Size

² Flat- Response



نمودار ۲- طیفهای نشری فلئورسانس a- کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین در محلول SDS ۱۰ درصد، b- استخراج شده از انگلها بدون حضور کمپلکس، c- SDS ۱۰ درصد. تحریک در طول موج ۴۱۷ نانومتر انجام شد و پهنای باند تحریک و نشر مانوکروماتورها به ترتیب ۱۰ و ۵ نانومتر بوده است.

۳-۳- تعیین زمان مناسب انکوباسیون کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین با پروماستیگوتها

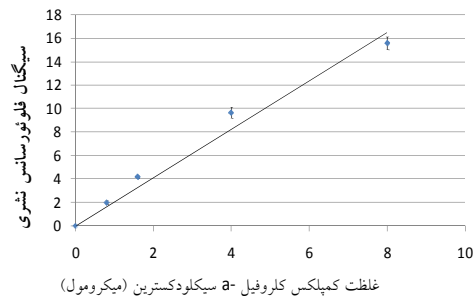
به منظور تعیین زمان مناسب انکوباسیون پروماستیگوتها با رنگدارو میزان کمپلکس ورودی به پروماستیگوتها ارزیابی گردید. بر همین اساس پس از زمانهای متفاوتی از انکوباسیون پروماستیگوتها با رنگدارو، سطح سیگنال در هر نمونه تعیین شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد سطح سیگنال به مقدار کل کلروفیل در هر نمونه تبدیل و در مرحله بعد با تقسیم این مقدار بر تعداد پروماستیگوتهای زنده موجود در هر نمونه مقدار کلروفیل a^۱ استخراج شده به ازای هر پروماستیگوت محاسبه گردید. همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می گردد حتی دو ساعت پس از آغاز انکوباسیون میزان جذب^۱ کلروفیل a توسط انگل معنی دار بوده است ولی تغییرات آن تا ۲۴ ساعت بعد، مشهود نمی باشد و تفاوت آماری معنی داری بین دیگر زمانهای انکوباسیون مشاهده نمی گردد. با توجه به این نتایج و مطالعه کسما و همکاران [۲۱]، مدت زمان ۲۴ ساعت برای انکوباسیون انتخاب شد.

۳-۲- رسم منحنی استاندارد کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین

برای تعیین غلظت کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین در داخل انگلها بر اساس نتایج فلئوریمتری، نیاز به رسم منحنی استاندارد این کمپلکس بود. طول موجهای تحریک و نشر به ترتیب ۴۱۷ و ۶۷۲ نانومتر انتخاب گردید. منحنی استاندارد مربوطه در نمودار (۳) مشاهده می شود. این دادهها میانگین سه سری اندازه گیری می باشد. منحنی استاندارد مورد بحث خطی بوده و از معادله زیر تبعیت می کند:

$$F = 2.063 \times C; \quad R^2 = 0.997 \quad (1)$$

در معادله بالا، F سیگنال فلئورسانس نشری، C غلظت کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین بر حسب میکرومولار و R² ضریب همبستگی منحنی می باشد.

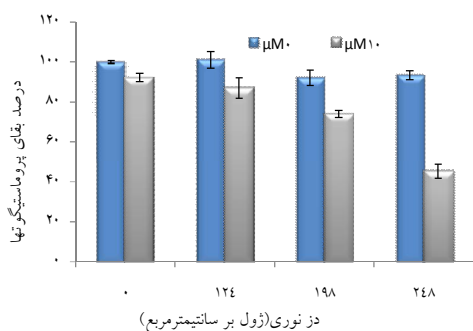


نمودار ۳- منحنی استاندارد تعیین کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین از روی سیگنال حاصل از فلئوریمتری (excitation = ۴۱۷nm, emission = ۶۷۲nm). دادهها میانگین سه بار اندازه گیری و انحراف معیار روی میانگین است.

¹ Uptake

۳-۵- نتایج درمانها

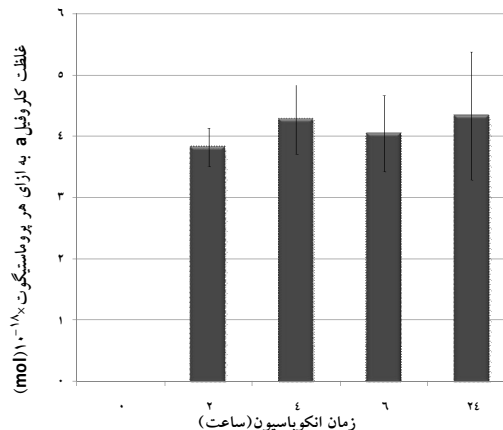
این بخش از مطالعه در غلظت ۱۰ میکرومولار از کلروفیل a، مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت و با اعمال دزهای نور ۱۲۴، ۱۹۸، ۲۴۸ ژول بر سانتیمتر مربع انجام گرفت. درصد بقای پروماستیگوت‌های گروه‌های مورد آزمایش پس از درمان در نمودار (۶) آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که دزهای فوق در غیاب رنگ‌دارو اثر معنا داری بر تکثیر و بقای پروماستیگوت‌ها نداشته و با دز نوری ۱۲۴ ژول بر سانتیمتر مربع در غلظت ۱۰ میکرومولار از کمپلکس کلروفیل a درصد بقای پروماستیگوت‌ها به ۸۷/۲، در دز نوری ۱۹۸ ژول بر سانتی‌متر مربع درصد بقا به ۷۴/۲ و با دریافت دز نوری ۲۴۸ ژول بر سانتی‌متر مربع درصد بقا به ۴۵/۳ کاهش یافته است. با افزایش دز نوری از ۱۲۴ به ۱۹۸ و سپس به ۲۴۸ ژول به سانتی‌متر مربع تفاوت آماری معنی داری در غلظت ۱۰ میکرومولار دیده شد. LD₅₀ نور برای PDT تقریباً ۲۴۶ ژول بر سانتی‌متر مربع بدست آمد.



نمودار ۶- درصد بقای پروماستیگوت‌ها ۲۴ ساعت پس از درمان. (غلظت کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین ۱۰ میکرومولار)، داده‌ها بیانگر میانگین سه بار اندازه‌گیری و خطای استاندارد روی میانگین می‌باشد.

۴- بحث

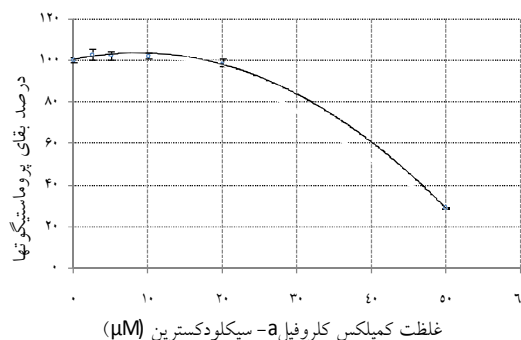
این گزارش اولین مطالعه انجام شده با بهره‌گیری از کمپلکس کلروفیل a-سیکلودکسترین به روش فتوداینامیک بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌باشد. با توجه به اینکه غیر از ۲ ساعت که کمترین میزان کمپلکس ورودی به هر پروماستیگوت در آن اندازه‌گیری شد بین سایر زمانهای انکوباسیون، تفاوت معنی داری دیده نشد و همچنین غلظت



نمودار ۴- مقدار کلروفیل a ورودی به هر پروماستیگوت پس از زمانهای انکوباسیون متفاوت انگلها با غلظت ۱۰ میکرومولار از کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین. داده‌ها بیانگر میانگین سه بار اندازه‌گیری و انحراف معیار روی میانگین است.

۳-۴- سمیت کمپلکس سیکلودکسترین-کلروفیل a بر پروماستیگوت‌ها

پس از تیمار پروماستیگوت‌ها با غلظتهای مختلفی از کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین به مدت ۲۴ ساعت، درصد بقای آنها با آزمون MTS بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده (نمودار ۵) غلظتهای بالاتر از ۲۰ میکرو مولار از کمپلکس مورد نظر کشنده می‌باشد. با توجه به اینکه غلظت ۱۰ میکرومولار از کمپلکس برای پروماستیگوت‌ها کشنده نبود و همچنین بر پایه مطالعات کسما و همکارانش [۲۱] و دنتوتو و همکارانش [۲۲] که از همین غلظت از کلروفیل a برای انجام درمانهای فتوداینامیک روی سلولهای Jurkat مربوط به لوسمی انسانی استفاده کرده‌اند غلظت اخیر برای درمانها انتخاب شد.



نمودار ۵- سمیت کمپلکس کلروفیل a- سیکلودکسترین. داده‌ها بیانگر میانگین سه بار اندازه‌گیری و انحراف معیار روی میانگین است.

۱۰ میکرومولار از کمپلکس اثر کشنده‌ای بر پروماستیگوتها نداشت. مدت زمان ۲۴ ساعت برای انکوباسیون و غلظت ۱۰ میکرومولار از کمپلکس برای درمان در نظر گرفته شد. کمپلکس بکار رفته در این تحقیق، بدون نوردهی، در تاریکی سمیت ایجاد نکرده است. در غلظت ۱۰ میکرومولار بین درصد بقای سه گروه درمان که دزهای نوری با انرژی ۱۲۴، ۱۹۸، ۲۴۸ ژول بر سانتی متر مربع را دریافت کرده‌اند، تفاوت معنی‌داری ثبت شد. کسما و همکارانش مطالعه‌ای با استفاده از کمپلکس کلروفیل a با هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین بر روی سلولهای Jurkat انجام دادند. نتایج نشان داد که بعد از نوردهی به وسیله دیود نوری (۶۶۰ نانومتر و ۵۰ میلی‌وات) هیچ کاهش در بقای سلولی دیده نشد [۲۱]. بر اساس این مطالعه حضور کلروفیل a اگر چه اندکی سمیت سلولی داشته، ولی سمیت نوری نشان نداده است. این نتیجه می‌تواند ناشی از عواملی چون ناشی از عدم کاهش غلظت FCS در مطالعه مذکور حین انکوباسیون با رنگ‌دارو، پایین بودن شدت نور و عدم تطابق طیف نوری دیود نوری مورد استفاده با قله جذب کمپلکس بوده باشد.

دنتوتو و همکارانش نیز مطالعه‌ای با استفاده از کمپلکس کلروفیل a با هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین بر روی سلولهای Jurkat انجام دادند. نتایج نشان داد که بعد از ۱۸۰ ثانیه نوردهی با دیود لیزر (۶۸۸ نانومتر و ۲/۱۲ میلی‌وات بر سانتیمترمربع) تقریباً ۵۰٪ مرگ سلولی در سلولهای انکوبه شده با کمپلکس کلروفیل a-سیکلودکسترین اتفاق می‌افتد [۲۲]. این نتیجه با بقای سلولی بدست آمده در تحقیق حاضر در دز نوری بالاتر کاملاً قابل مقایسه است. با توجه به عدم انجام تحقیق مشابه با استفاده از کلروفیل a، بد نیست مقایسه‌ای هم بین نتایج بدست آمده در این مطالعه با استفاده از سایر حساس کننده‌های نوری روی پروماستیگوت‌ها انجام گیرد. در گزارش آکیلو و همکاران که مربوط به مطالعه‌ای در شرایط برون‌تنی با آمینولونیلک اسید (ALA) می‌باشد کاهش در تعداد پروماستیگوت‌ها

بعد از PDT دیده نشد. به این دلیل که انگل لیشمانیا فاقد ژنی است که آنزیمهای مسئول سنتز "هم" را کد می‌کند. بدین ترتیب انگل لیشمانیا قادر نیست پروتوپورفیرین^۹ را از ALA یا MAL^۳ به طور مؤثر سنتز نماید [۳]. در مطالعه دیگری که توسط دیوتا و همکاران، با استفاده از حساس کننده آلومینیوم فتالوسیانین کلراید بر روی پروماستیگوت‌ها انجام شد، ۵۰ درصد لیز سلولی برای غلظت ۱ میکرومول بر میلی‌لیتر از رنگ‌دارو در دز نوری ۰/۸ ژول بر سانتی‌مترمربع و بطور مشابه برای غلظت ۵ میکرومول بر میلی‌لیتر از رنگ دارو در دز نوری ۰/۵ ژول بر سانتی‌مترمربع بلافاصله بعد از درمان دیده شد [۴]. بدین ترتیب از آنجا که بازده PDT با استفاده از رنگ‌داروی طراحی شده در این مطالعه نتایج قابل قبول و مشابهی با آلومینیوم فتالوسیانین کلراید بر روی پروماستیگوت‌ها فراهم نموده است، پیش‌بینی می‌شود با بررسی‌های بعدی بر روی آماستیگوت‌ها بتوان با انتخاب بهینه پارامترهای غلظت رنگ‌دارو و دز نور، به کارایی مناسبی از درمان دست یافت.

۵- نتیجه گیری

بنابراین با توجه به موارد فوق و قابل حل بودن کمپلکس کلروفیل a- هیدروکسی پروپیل گاما سیکلودکسترین در محیطهای آبی بر خلاف کلروفیل aی خالص، این رنگ‌دارو را به عنوان یک حساس‌کننده نوری امیدوارکننده در درمانهای فتوداینامیک بر روی لیشمانیوز جلدی کاندید می‌گردد. ولی قضاوت قطعی موکول به تکمیل آزمایشات خواهد بود.

۶- تشکر و قدردانی

نویسندگان ضمن سپاسگزاری از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حمایت مالی این تحقیق را عهده دار بودند، از جناب آقای دکتر مهرداد ایرانشاهی عضو مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، سرکار خانم

¹ Heme

² PpIX

³ Methyl- Aminolevulinat

می‌نمایند. این مقاله از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی منتج شده است.

دکتر حوریه نصیرلی کارشناس مسئول آزمایشگاه آنالیز مرکز تحقیقات دارویی، و جناب آقای دکتر عشقی دانشیار گروه شیمی دانشگاه فردوسی مشهد نیز به خاطر همکاریهای بی‌دریغ در انجام امور مختلف این پروژه قدردانی و تشکر

منابع

1. Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003; 2(1):2-14.
2. Talari SA, Talaei R, Shajari G, Vakili Z, Taghavi Ardakani A. Childhood cutaneous leishmaniasis: report of 117 cases from Iran. *Korean J Parasitol.* 2006; 44(4):355-60.
3. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci.* 2007; 6(10):1067-75.
4. Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP. Photodynamic Sensitization of Leishmania amazonensis in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(11):4474-84.
5. Bristow CA, Hudson R, Paget TA, Boyle RW. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2006; 3: 162-7.
6. Postigo F, Sagristá ML, De Madariaga MA, Nonell S, Mora M. Photosensitization of skin fibroblast and hela cells by three chlorin derivatives: Role of chemical structure and delivery vehicle. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758(5):583-96.
7. O'Riordan K, Akilov OE, Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagn Photodyn Ther* 2005;2(4):247-62.
8. Kalkak k, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42(3):389-413.
9. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas).* 2003; 39(12):1137-50.
10. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist.* 2006; 11(9):1034-44.
11. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 2005; 4(3):283-93.
12. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):259-68
13. Agostiano A, Catucci L, Cosma P, Fini P. Aggregation processes and photophysical properties of chlorophyll a in aqueous solutions modulated by the presence of cyclodextrins. *Phys. Chem . Chem. Phys.* 2003; 5: 2122-8.
14. Moore JV, West CML, Whitehurst C. The biology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 1997; 42:913-35.
15. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Gotab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* 2005;52(2):339-52.
16. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol.* 2008;154(1):1-3.

17. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte TJ, et al. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against leishmania parasites. *Chem Biol.* 2006; 13(8):839-47.
18. Rosenbach-Belkin V, Chen L, Fiedor L, Tregub I, Paviotsky F, Brumfeld V, et al. Serine Conjugates of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll: Photocytotoxicity in vitro and Tissue Distribution in Mice Bearing Melanoma Tumors. *Photochem Photobiol.* 1996; 64(1):174-81.
19. Hargus JA. Naturally-driven porphyrin and chlorine photosensitizer for photodynamic therapy. [dissertation on the Internet]. Louisiana State University; 2005 [cited 2011 Oct 1]. Available at: http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11212005-190249/unrestricted/Hargus_thesis.pdf.
20. Koizumi H, Itoh Y, Hosoda S, Akiyama M, Hoshino T, Shiraiwa Y, et al. Serendipitous discovery of Chl d formation from Chl a with papain. *Sci and Technol of Advanced Materials* 2005; 6: 551-7.
21. Cosma P, Fini P, Rochira S, Catucci L, Castagnolo M, Agostiano A, et al. Phototoxicity and cytotoxicity of chlorophyll a/cyclodextrins complexes on Jurkat cells. *Bioelectrochemistry.* 2008; 74(1):58-61.
22. Dentuto PL, Catucci L, Cosma P, Fini P, Agostiano A, Hackbarth S, et al. Cyclodextrin/chlorophyll a complexes as supramolecular photosensitizers. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70(1):39-43.
23. Dentuto PL, Catucci L, Cosma P, Fini P, Agostiano A. Photophysical and electrochemical properties of chlorophyll a-cyclodextrins complexes. *Bioelectrochemistry.* 2004; 63(1-2):117-20.
24. Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi MH, Layegh P, Rajabi O, Movahhed Ghodsinia R. Liposomal zinc phthalocyanine as a potential agent for photodynamic therapy of leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2010; 76(4):417-8.