Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ٤، شماره ٣ و ٤، بهار و تابستان ١٣٨٢

بررسی چگونگی مقاومت در درمان لیشمانیوز جلدی با مگلومین آنتی‌موان (گلوکانتیم): مقایسه حساسیت انگل جدا شده از بیمار به دارو در محیط کشت با پاسخ کلینیکی بیمار به درمان

مجید محمودی[1*] (Ph.D) ، سیدجعفر نصرت‌آبادی[2] (M.Sc) ، علی‌رضا فکری[1] (M.D) ، عباس‌حق‌پرست[1] (Ph.D) و ایرج شریفی[2] (Ph.D)

١- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، معاونت پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان

٢- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اینکه درمان اساسی در بیماری لیشمانیوز با ترکیبات آنتی‌موان، شامل پنتوستام و گلوکانتیم، صورت می‌گیرد و مقاومت داروئی بیمار به این ترکیبات خصوصاً در مناطق اندمیک یکی از مشکلات اصلی در این بیماری است. این مطالعه، جهت ارزیابی حساسیت و با مقاومت سوش‌های Leishmania tropica جدا شده از بیماران را در محیط کشت و در حالت تکثیر داخل سلولی (فرم اماستیگوئی) در مقابل دو ترکیب سه ظرفیتی و پنج ظرفیتی آنتی‌موان، انجام گردید و نتایج آن با پاسخ درمانی بیماران مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: جهت انجام این بررسی از بیمار مبتلا به لیشمانیوز جلدی در منطقه اندمیک نمونه‌برداری شد. انگل‌های جدا شده از هر بیمار در محیط‌های جامد و مایع، کشت و تکثیر گردید. سپس با استفاده از ماکروفاژهای زنده مایع صفاق موش، کشت و تکثیر انگل در داخل سلول‌های ماکروفاژ و در پلیت‌هایی مخصوص فراهم گردید. کاهش رشد انگل در داخل ماکروفاژ و همین‌طور کاهش درصد ماکروفاژهای آلوده شده در اثر اضافه نمودن دارو تعیین و بدین وسیله میزان حساسیت انگل در مقابل این ترکیبات در حالت In vitro مشخص گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصله از این بررسی نشان داد که ترکیب آنتی‌موان سه ظرفیتی با حداقل غلظت ١٠٠ g/ml به طور معنی‌دار باعث کاهش تکثیر داخل سلولی انگل جدا شده از هر بیمار می‌گردد ($P<0/05$) . مقایسه آماری بین میانگین تعداد آماستیگوت‌های داخل ماکروفاژ با میزان مداومت زخم بیانگر وابستگی این دو معیار به طور معنی‌دار نبود. همین‌طور بین میزان درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل برای هر سوش جدا شده از بیمار و مدت زمان بهبودی در همان بیمار، وابستگی معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصله، احتمالاً نشان دهنده عدم ارتباط بین میزان تکثیر و قدرت تهاجم و یا شدت بیماری‌زایی سوش انگل جدا شده از بیمار با میزان مداومت و یا توسعه زخم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا تروپیکا، مگلومین آنتی‌موان، پتاسیم آنتی‌موان تارتارات، مقاومت دارویی

مقدمه

لیشمانیازیس به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که توسط تک‌یاخته‌ای به نام لیشمانیا از رده تاژک‌داران ایجاد می‌شود. این انگل برحسب محیط زندگی خود به دو شکل تاژک‌دار (پروماستیگوت) و بی‌تاژک (آماستیگوت) دیده می‌شود [١،٢]. این انگل که در خون و نسج زندگی می‌کند، در بدن مهره‌داران درون سلول‌های بیگانه‌خوار تک هسته‌ای، سلول‌های سیستم رتیکولواندوتلیال، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سایر

* نویسنده مسئول. تلفن: ٠٣٤١-٢١١١٠١٠، نمابر: ٠٣٤١-٢١١١٠١٠، E-mail: haghparast@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های بیگانه‌خوار به شکل آماستیگوت و در حشرات ناقل و محیط کشت به صورت خارج سلولی و به شکل پروماستیگوت مشاهده می‌گردد. در داخل سلول، این انگل از طریق تقسیم دوتایی میتوز تکثیر می‌یابد و سپس سلول‌های میزبان که پر از انگل هستند پاره شده و بدین ترتیب سلول‌های جدیدی مورد تهاجم قرار می‌گیرد [١،٤].

روش درمانی در این بیماری بیشتر به صورت تجویز ترکیبات آنتی‌موان که شامل گلوکانتیم یا مگلومین آنتی‌موان (Meglumine antimoniate) و سدیم استیبوگلوکونات (Sodium stibogluconate) یا پنتوستام می‌باشد که در بیشتر مناطق دنیا به‌عنوان بهترین نوع درمان شناخته شده است؛ ولی گزارشات متعدد کلینیکی به‌خصوص در مناطقی که بیماری به‌صورت اپیدمیك یافت می‌شود حاکی از افزایش بیماران مقاوم نسبت به مواد دارویی مذکور است [١۶]. شواهدی در دست است که نشان می‌دهد مقاومت به علت پیدایش سوش‌های مقاوم به ترکیبات آنتی‌موان فوق‌الذکر است [٩]. Gorgl و همکارانش در یك مطالعه که به صورت In-vitro در مورد چگونگی مقاومت انگل‌های لیشمانیا نسبت به ترکیبات آنتی‌موان کار می‌کردند، به این نتیجه رسیدند که عدم پاسخ‌گویی بیمار به درمان با ترکیبات آنتی‌موان به علت پیدایش سوش‌های مقاوم به انگل است [٧]. تحقیقات دیگر مؤید این نظر است که بروز مقاومت به داروهایی از جمله ترکیبات آنتی‌موان، نتیجه درمان ناقص یا ناکافی بیماران بوده که در بعضی از آنها باعث عود بیماری شده است [١۴]. مطالعه دیگری نشان داد که سوش مقاوم انگل، قدرت بیماری‌زایی و تکثیر بیشتری نسبت به سوش حساس ندارد [٨]؛ بعلاوه تأثیر کم آنتی‌موان پنج ظرفیتی در درمان بیماران با عفونت‌های همزمان (عفونت لیشمانیایی و یك عفونت ثانوی) اغلب مورد توجه بوده که این امر باعث تحقیق بر روی ترکیبات ضدلیشمانیایی شده است [١٠]. جهت بررسی تجربی اثر دارو بر روی انگل، مطالعه بایستی بر روی فرم داخل سلولی (آماستیگوئی) انگل صورت گیرد. متأسفانه بسیاری از مطالعات مربوط به ارزیابی اثرات دارویی ضدلیشمانیا و یا حتی تولید سوش‌های مقاوم به دارو، با تولید و تکثیر پروماستیگوت‌ها صورت گرفته درحالی‌که این مرحله از سیکل زندگی انگل، درون حشره ناقل مشاهده می‌گردد. از این گذشته فرم آماستیگویی انگل در بسیاری از خصوصیات بیوشیمیایی از قبیل فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، دهیدروژناز، ریبونوکلئاز و پراکسیداز از فرم اماستیگوئی انگل متمایز می‌باشد [۶، ١۵].

پیدایش و تکامل روش‌های جدید آزمایشگاهی جهت کشت داخل سلولی انگل لیشمانیا ما را قادر نمود که در این بررسی اثر دارو بر روی مرحله داخل سلولی انگل انجام گردد. در این مطالعه میزان حساسیت انگل جدا شده از بیمار به صورت In-vitro و در حالت رشد داخل سلولی انگل نسبت به دو نوع ترکیب آنتی‌موان سه ظرفیتی (پتاسیم آنتی‌موان تارتارات) و آنتی‌موان پنج ظرفیتی (مگلومین آنتی‌موان) ارزیابی شد و از طرفی با پاسخ کلینیکی بیمار به این دارو مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

دارو. در این مطالعه از دو ترکیب آنتی‌موان، یکی سه ظرفیتی به نام پتاسیم آنتی‌موان تارتارامتیك (Merck, Germany) و دیگری پنج ظرفیتی به نام مگلومین آنتی‌موان یا گلوکانتیم (Specia, France) استفاده گردید.

درمان بیماران. بعد از نمونه‌برداری از زخم بیماران و تشخیص میکروسکوپی انگل از نمونه تهیه شده، همگی بیماران با مگلومین آنتی‌موان به صورت تزریق داخل ضایعه یا داخل درم و به میزان ١ تا ٣ میلی‌لیتر بر حسب وسعت ضایعه و یك‌بار در هفته و به مدت ٩ هفته مورد درمان قرار گرفتند و میزان بهبودی زخم در هر هفته در فرم مربوط به بیمار گزارش می‌گردید.

جدا نمودن ایزوله‌ها از بیمار و کشت و تکثیر انگل. با مراجعه به مرکز بهداشت شهرستان بم، از ضایعات مختلف روی بدن بیمارانی که مشکوك به ابتلاء به سالك بودند؛ نمونه‌برداری گردید. نمونه‌ها را با رعایت شرایط استریل در کنار شعله به

www.SID.ir

Archive of SID

لوله حاوی محیط N.N.N انتقال دادیم. همزمان از محیط ضایعه نمونه‌های اسمیر مستقیم نیز تهیه گردید. بعد از رشد مناسب انگل در محیط ۳N، در دمای c ۲۴ و رسیدن به فاز لگاریتمی، جهت کشت و تکثیر انبوه، انگل‌ها از فاز مایع محیط ۳N به محیط مایع، تلقیح شدند. محیط مایع از RPMI-1640 حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی که قبلاً کامپلمان آن غیرفعال گردیده بود و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین به میزان Unit/ml ۱۰۰ و استرپتومایسین به میزان µg /ml ۱۰۰ تشکیل یافته بود. پروماستیگوت‌های هر یك از ایزوله‌ها پس از رسیدن به فاز رشد ثابت، مورد استفاده قرار گرفتند.

جدا کردن ماکروفاژ از مایع صفاق موش. جهت تهیه ماکروفاژ، در این تحقیق از موش‌های نژاد BALB/c استفاده شد. جهت این کار ۳ روز قبل از گرفتن مایع صفاق به میزان ۲ میلی‌لیتر PBS استریل حاوی محلول ۳ درصد تیوگلیکولات به صفاق موش تزریق شد. جهت جداکردن ماکروفاژهای مایع صفاق، ابتدا با استفاده از اتر، موش را کشته و بلافاصله در شرایط استریل و زیر هود لامینار پوست روی شکم حیوان جدا گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 با دقت و احتیاط به درون حفره صفاق تزریق گردید. همچنین به ازاء هر میلی‌لیتر از محیط کشت تزریق شده ۵ واحد هپارین تزریقی به محیط کشت اضافه شد، تا از لخته شدن مایع جلوگیری شود. بعد از آن با سرنگ استریل، محیط کشت مجدداً به میزان تزریق شده به داخل سرنگ کشیده شد و در داخل لوله‌های استریل انتقال داده شد؛ سپس محیط کشت حاوی سلول‌های جمع‌آوری شده از صفاق موش در دور rpm ۱۸۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی ۲ بار دیگر با محیط کشت RPMI-1640 سانتریفوژ و شستشو داده شد و سپس شمارش گردید. همچنین درصد زنده بودن (Viability) سلول‌ها قبل از مورد استفاده قرار دادن توسط رنگ تریپان بلو تعیین شد.

کشت داخل سلولی انگل با استفاده از ماکروفاژهای تهیه شده. جهت کشت ماکروفاژ از پلیت‌های سه‌خانه‌ای استریل استفاده شد. در داخل هر خانه پلیت یك عدد لامل استریل با ابعاد ۲۲×۲۲ قرار داده شد؛ سپس از سوسپانسیون سلولی ماکروفاژ که حاوی یك میلیون سلول در هر میلی‌لیتر بود، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر (۲×۱۰^{۵} سلول) روی لامل ریخته شد. پلیت‌ها به مدت یك ساعت جهت چسبیدن ماکروفاژها به سطح لامل در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت مناسب قرار داده شد. سه لامل هر یك از پلیت‌ها بدین ترتیب به کار برده شد که لامل اول به کنترل سلول، اختصاص می‌یافت که فقط در آن از سوسپانسیون سلولی می‌ریختیم، لامل دوم به کنترل سلول به علاوه انگل اختصاص می‌یافت که بدان دارو اضافه نمی‌گردید؛ لامل سوم جهت غلظت‌های مختلف دارو به کار برده می‌شد که در مراحل بعد از اتصال سلول به لامل و اضافه کردن انگل، به آن دارو اضافه می‌گردید. پس از یك ساعت محیط اضافه روی سطح لامل برداشته شد و به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروماستیگوت‌های انگلی تهیه شده فوق که حاوی یك میلیون انگل بود به سطح لامل‌ها اضافه گردید. پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت انکوبه نموده، بعد از آن محیط رویی هر یك از لامل‌ها برداشته شد و به سطح تمام لامل‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI-1640 کامل اضافه گردید. سپس غلظت‌های مختلف دارو به همگی لامل‌ها بجز لامل‌های کنترل اضافه شد. از دو ترکیب آنتی‌موان سه ظرفیتی (پتاسیم آنتی‌موان تارتاراِمتیك) و پنج ظرفیتی (مگلومین آنتی‌موان) استفاده گردید. غلظت‌های تهیه شده به نحوی بود که در نهایت انگل و ماکروفاژها در معرض غلظت‌هایی از دارو معادل µg/ml ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 نگه داشته شدند. بعد از این مدت، لامل‌ها را شسته و خشك و رنگ‌آمیزی شدند. در بررسی میکروسکوپی، همگی لامل‌هایی که به آنها سلول و انگل (کنترل) و یا سلول و انگل بعلاوه دارو اضافه گردیده بود از نظر تعداد درصد ماکروفاژ آلوده شده به انگل و همین‌طور تعداد آماستیگوت‌های داخل سلولی بررسی شدند و درنهایت

www.SID.ir

Archive of SID

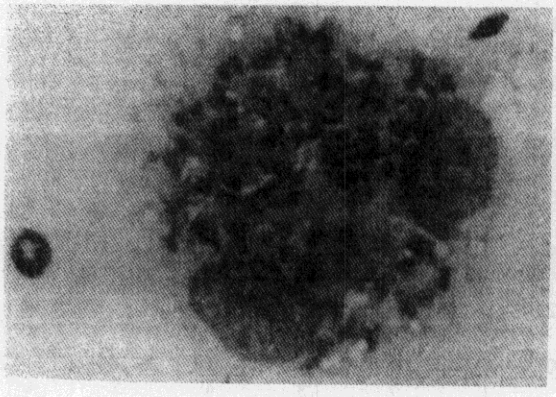
میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در یك ماکروفاژ از صد عدد سلول بررسی شده تعیین گردید.

روش‌های آماری. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزارSPSS (Version 9) استفاده گردید. در این آنالیز از آزمون t دانشجویی و رتبه علامتی Wilcoxon برای نمونه‌های جفت شده بهره گرفته شد. از آزمون همبستگی Pearson جهت یافتن همبستگی بین تعداد انگل‌های داخل ماکروفاژ و مدت زمان مداومت زخم استفاده گردید. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

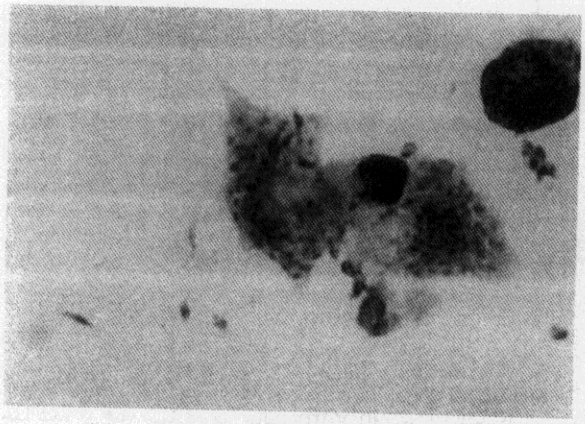
بررسی میکروسکوپی و نتایج تأثیر ترکیب آنتی‌موان بر تکثیر داخل سلولی انگل. از ۱۶ بیماری که جهت تهیه ایزوله از هر کدام و کشت انبوه انگل و همین‌طور جهت ارزیابی پاسخ درمانی به گلوکانتیم مورد بررسی قرار گرفتند، منجر به آنالیز نهائی ۱۲ بیمار گردید که پیگیری و کشت ایزوله جدا شده از آنها توأماً امکان‌پذیر گردید. مدت زمان لازم جهت بهبودی کامل زخم در بیماران، متفاوت بود و در نهایت زخم همگی بیماران بهبود یافت.

بررسی میکروسکوپی. در لامل‌های کنترل که سلول‌های ماکروفاژ و انگل را اضافه کرده بودیم، ماکروفاژهایی وجود داشت که تعداد زیادی انگل را فاگوسیته کرده بودند (تصویر شماره ۱).



تصویر ۱. تصویر ماکروفاژهایی که تعداد زیادی انگل را فاگوسیته کرده اند.

در لامل‌هایی که غلظت‌های مختلف آنتی‌موان پنج ظرفیتی گلوکانتیم به ماکروفاژهای حاوی انگل اضافه شده بودند، این ترکیب اثر ناچیزی در از بین بردن آماستیگوت‌های داخل سلول داشت، به طوری که غلظت‌هایی حدود ۲mg/ml را تحمل می‌نمودند و سلول‌ها حاوی آماستیگوت‌های بسیاری بود (تصویر شماره ۲).



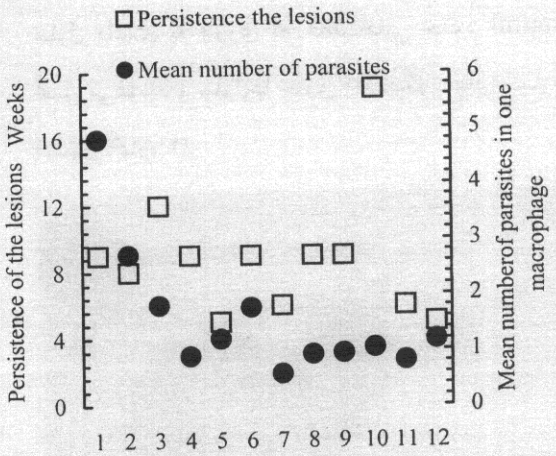
تصویر ۲. سلول‌های ماکروفاژ حاوی آماستیگوت‌های متعدد

زمانی که غلظت‌های مختلف آنتی‌موان سه ظرفیتی تارتارامتیك به کار برده شد، در غلظت‌های بالای ۲۰۰ µg/ml تقریباً همگی انگل‌های داخل سلولی از بین رفته بودند، در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰۰ µg/ml ماکروفاژها حاوی تعداد زیادی انگل بودند، در نهایت ۲ غلظت ۱۰۰ µg/ml و ۱۵۰ µg/ml مورد ارزیابی قرار گرفت (تصاویر شماره ۳، الف و ب). میانگین تعداد آماستیگوت‌های درون ماکروفاژ از یك‌صد ماکروفاژ بررسی شده، بعد از تأثیر داروی تارتارامتیك با غلظت ۱۰۰ µg/ml، برای هر یك از ایزوله جدا شده از بیماران در نمودار ۱ نشان داده شده است، علاوه بر این در این نمودار این میانگین‌ها با مدت زمان مداومت زخم تا بهبودی کامل در همان بیماران و در اثر درمان با ترکیب آنتی‌موان مقایسه شده است. مقایسه آماری این دو معیار، بیانگر وابستگی آنها به طور معنی‌دار نبود ($P<0/05$). در غلظت ۱۵۰ µg/ml دارو، همین نتیجه مشخص گردید. مقایسه بین در صد ماکروفاژهای آلوده به انگل در دو غلظت ۱۰۰ µg/ml و ۱۵۰ µg/ml، برای هر یك از ایزوله‌ها، با

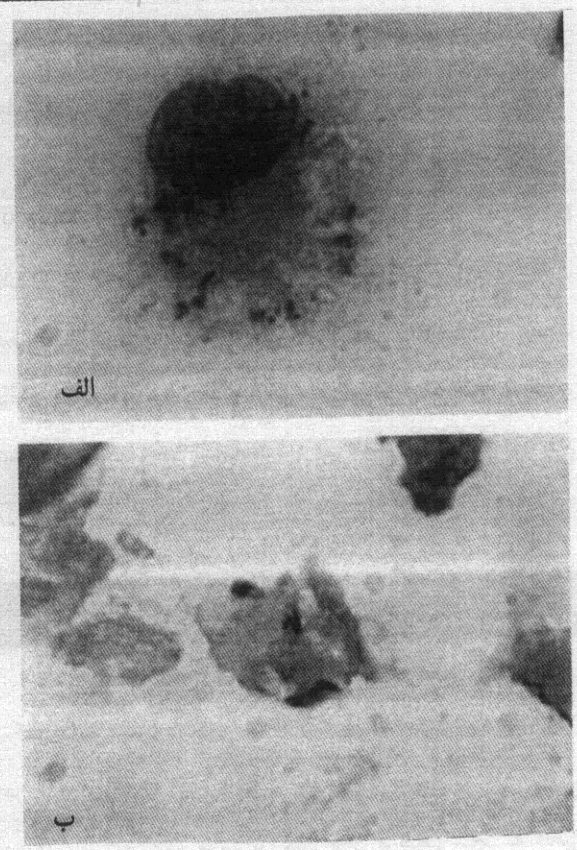
www.SID.ir

Archive of SID

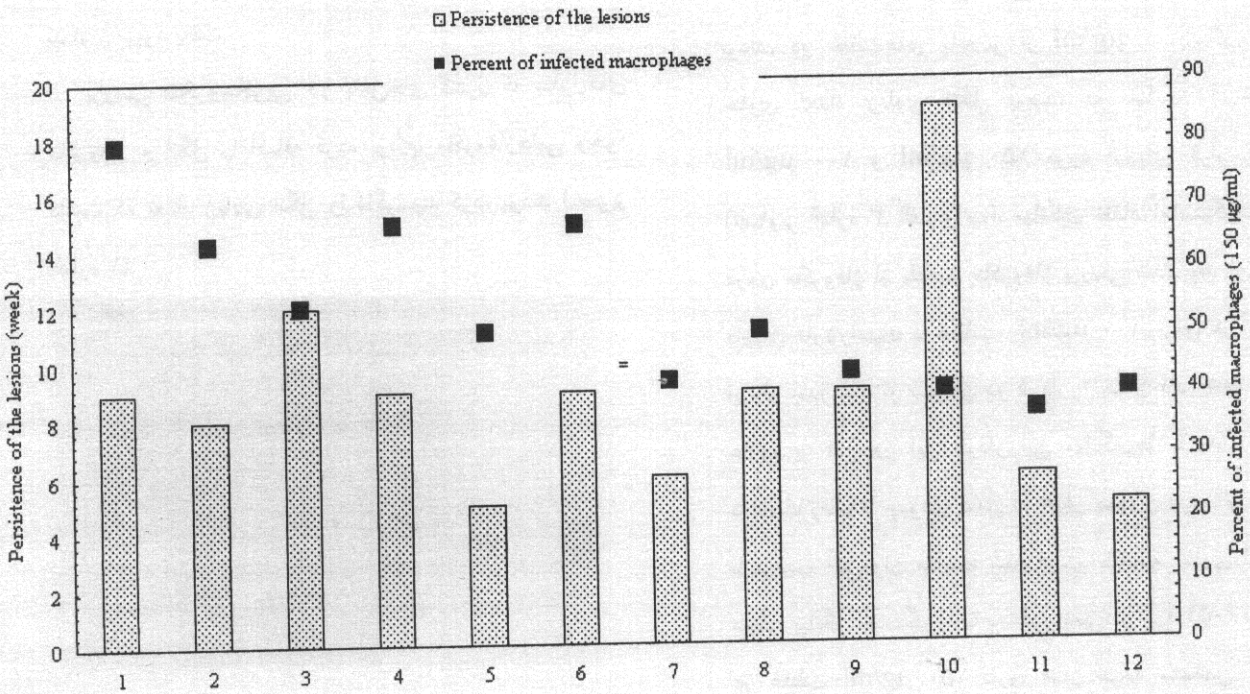
مدت زمان مقاومت زخم تا بهبودی کامل در همان بیماران وابستگی معنی‌داری مشاهده نشد($P<0/05$)، نمودار ۲.



نمودار ۱. مقایسه مدت زمان مداومت زخم در ۱۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوز جلدی بعد از درمان با گلوکانتیم با میانگین تعداد آماستیگوت‌های ایزوله جدا شده از همان بیماران در حالت in vitro بعد از تأثیر داروی سه ظرفیتی آنتیموان با غلظت 100 µg/ml



تصویر ۳. غلظت‌های مختلف آنتی‌موان سه ظرفیتی تارتارامتیک بر روی انگل‌های داخل سلولی در ماکروفاژها. الف: ماکروفاژهای حاوی انگل. ب: ماکروفاژهای فاقد انگل (که انگل‌ها توسط آنتی موآن سه ظرفیتی تاتارامتیک از بین رفته است).



نمودار ۲. مقایسه مدت زمان مداومت زخم در ۱۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوز جلدی بعد از درمان با گلوکانتیم با تعداد درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل از همان بیماران در حالت in vitro بعد از تأثیر داروی سه ظرفیتی آنتیموان در غلظت 150 µg/ml

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری لیشیمانیوز، یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در بسیاری از کشورهایی در حال توسعه و یا کشورهایی فقیر دنیا محسوب می‌گردد. درمان در این بیماری که معمولاً با ترکیبات آنتی‌موان پنج ظرفیتی و یا با Pentamidine و یا Amphotericin B صورت می‌گیرد؛ در بسیاری از موارد با مقاومت دارویی بیمار مواجه می‌گردد[۱۶]. یکی از علل عدم پاسخ درمانی بیمار، پیدایش سوش‌های مقاوم به دارو گزارش شده است [۷، ۹]. این مطالعه جهت بررسی چگونگی مقاومت در درمان لیشیمانیوز جلدی ناشی از L.tropica به صورت In vitro انجام گردید. بدین منظور بعد از جدا نمودن انگل از زخم بیمار از روش کشت داخل سلولی انگل استفاده گردید. کشت داخل سلولی انگل و یا ایجاد فرم اماستیگوئی و تکثیر یابنده انگل در داخل سلول و بررسی اثرات دارو بر فعالیت انگل یکی از بهترین روش‌های ارزیابی اثرات ضدلیشیمانیایی یك دارو می‌باشد [۲،۳،۵]. بعلاوه در این مطالعه از سلول‌های ماکروفاژ جهت رشد انگل استفاده گردید تا شرایط ایجاد شده، الگویی از رشد انگل به صورت In vivo و یا در داخل سلول میزبان باشد. مشاهده میکروسکوپی ماکروفاژهای کشت داده شده و تشخیص اماستیگوئی‌های داخل و خارج سلولی نمایانگر مطلوب بودن شرایط رشد بود (تصویر ۱). با اضافه نمودن دارو در غلظت‌های مختلف و تعیین غلظت مؤثر در جلوگیری از رشد و تکثیر انگل در داخل ماکروفاژ و یا کاهش تعداد آنها، و همین طور کاهش درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل، بیانگر تأثیر دارو بود (تصویر ۳).

در این مطالعه از دو نوع ترکیب آنتی‌موان، جهت ارزیابی اثر آنها در محیط کشت استفاده گردید. یکی فرم ۵ ظرفیتی آنتی‌موان به نام مگلومین آنتی‌موان که در درمان اشکال مختلف بیماری به کار می‌رود و دیگری فرم سه ظرفیتی این ترکیب به نام پتاسیم آنتی‌موان تارتارات $[(sb)^{+3}, 3H_2O]$ بود. نتایج این مطالعه نشان داد که سوش‌های جدا شده از بیماران در محیط کشت در مقابل مگلومین آنتی‌موان، که یك ترکیب آنتی‌موان پنج ظرفیتی است، نسبتاً مقاومند و یا این ترکیب اثر ضدلیشیمانیایی ناچیزی در محیط کشت دارد. تأثیر ضعیف مگلومین آنتی‌موان بر روی فرم اماستیگوئی گونه‌های دیگر لیشیمانیا نظیر Leishmania infantum در مطالعات دیگران هم گزارش شده است [۱۴]. در واقع یافته‌های مطالعه Sereno و همکاران که نشان دادند گونه L.infantum در محیط کشت با غلظتی از ترکیب مگلومین آنتی‌موان معادل ۱/۲۸ mg/ml را تحمل می‌نماید با یافته‌های مطالعه حاضر که بر روی ایزوله‌های نوع L.tropica صورت گرفته هم‌خوانی دارد و همان‌طور که ثابت شده [۶،۱۱،۱۲]، ترکیب آنتی‌موان پنج ظرفیتی بایستی به ترکیب سه ظرفیتی احیاء گردد تا بر انگل اثر داشته باشد. از طرفی در این مطالعه، تمام سوش‌های L.tropica جدا شده از بیماران در محیط کشت و بعد از ورود آنها به ماکروفاژ و تبدیل به فرم اماستیگوئی در مقابل پتاسیم آنتی‌موان تارتارات حساس بوده و غلظت مناسب این دارو (از ۱۰۰ µg/ml تا ۲۰۰ µg/ml) باعث توقف رشد اکثریت انگل‌ها می‌گردد. این یافته هم با کارهایی انجام شده بر روی سه نوع انگل لیشیمانیا یعنی L.mexicana، L.amazonensis و L.infantum که به ترتیب باعث لیشیمانیوز پوستی، لیشیمانیوز پوستی منتشر و فرم احشایی بیماری می‌گردند مطابقت دارد [۱۳]. مطالعه مذکور نشان داد که حداقل غلظتی از دارو (ترکیب آنتی‌موان سه ظرفیتی)، از ۴ µg/ml تا ۱۰۰ µ g/ml (بسته به گونه لیشیمانیای مورد مطالعه)، باعث توقف رشد اماستیگوئی‌های داخل سلولی می‌گردد؛ که در مطالعه حاضر حداقل غلظت مؤثره جهت جلوگیری از رشد ایزوله‌های L.tropica معادل ۱۰۰µg/ml بود. بعلاوه نتایج مطالعه حاضر حاکی از بالا بودن اثرات سمی ترکیب آنتی‌موان سه ظرفیتی نسبت به ترکیب آنتی‌موان پنج ظرفیتی در از بین بردن انگل در حالت رشد داخل سلولی است که این یافته هم در مطالعه Sereno و Lemesre که بر روی سه گونه لیشیمانیا (L.mexicana، L.amazonensis و L.infantum) صورت گرفته، گزارش شده است؛ منتها L.infantum نسبت به دو گونه دیگر به مراتب نسبت به داروی فوق حساس‌تر است [۱۳]. همچنین مطالعات Sereno

www.SID.ir

Archive of SID

و Lemesre نشان می‌دهد که سوش‌های معمولی لیشمانیا در خارج از سلول در مقابل غلظتی از ترکیب آنتی‌موان سه ظرفیتی معادل ۱/۳۲±۰/۰۶μg/ml حساس می‌باشند. درحالی‌که غلظت دارو در داخل ماکروفاژ بسیار بالاتر از این مقدار است یعنی غلظتی معادل ۷۲ μg/ml تا ۲۱۵ μg/ml تا بر اماستیگوتی‌های داخل ماکروفاژ تأثیر نماید و همان‌طور که نتایج مطالعه حاضر هم نشان داد که غلظتی از دارو معادل ۱۰۰ μg/ml بایستی به محیط کشت اضافه گردد تا بر اماستیگوتی‌های داخل ماکروفاژ اثر نماید، چنین به نظر می‌رسد که ماکروفاژها نقش عمده در متابولیزه نمودن دارو ایفا می‌نمایند و همان‌طورکه گزارش شده ماکروفاژها به‌عنوان ذخیره کننده دارو عمل می‌نمایند تا بدین وسیله انگل‌های داخل ماکروفاژ تحت تأثیر مداومت دارو قرار گیرند[۱۲].

در این مطالعه، میانگین تعداد انگل‌های داخل یك ماکروفاژ از ۱۰۰ عدد ماکروفاژ بررسی شده محاسبه گردید. نمودار ۱ نشان دهنده این میانگین‌ها از ۱۲ سوش L.tropica جدا شده از بیماران است که در غلظت ۱۰۰ μg/ml محاسبه شده است. از طرفی مدت زمان بهبودی و یا میزان مداومت زخم تا بهبودی کامل آنها هم در این بیماران نشان داده شده است. مقایسه آماری در تعیین وابستگی بین این دو معیار بیانگر این وابستگی به طور معنی‌دار نبود. در هر صورت عدم وابستگی این دو، نمایانگر عدم وابستگی بین میزان تکثیر و قدرت تهاجم انگل یا توسعه زخم می‌باشد؛ بعلاوه بین میزان درصد ماکروفاژهای آلوده به انگل و مدت زمان مداومت زخم هم وابستگی معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد که آن هم احتمالاً نشان‌گر عدم ارتباط بین قدرت آلوده‌کنندگی انگل به سایر ماکروفاژها و توسعه زخم می‌باشد.

نتایج این بررسی نشان دهنده عدم وابستگی معنی‌داری بین حساسیت انگل در محیط کشت در هنگام تکثیر داخل سلولی، در مقابل ترکیبات آنتی‌موان با چگونگی پاسخ درمانی بیماران بود به عبارت دیگر، در بیماران مورد ارزیابی بین کاهش رشد انگل در محیط کشت در مقابل این ترکیبات و مدت زمان بهبودی بیماران در اثر درمان به این ترکیبات وابستگی معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان به واسطه تصویب و تقبل هزینه‌های این مطالعه و از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و فضای مناسب قدردانی می‌گردد.

منابع

[۱] صائبی، ا.، بیماری‌های انگلی در ایران، جلد اول، چاپ پنجم، سازمان انتشارات و آموزش انقلاب اسلامی، ۱۳۶۹، ۱۸۵-۲۰۸

[2] Bates, P.A., Axenic culture of Leishmania amastigotes, Parasitol. Today, 9 (1993) 143-146.

[3] Berman, J.D. and Lee, L.S., Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages, J. Parasitol., 2 (1984) 220-225.

[4] Brown, H.W. and Neva, F.A., Basic clinical parasitology, 5th Edition, 1993, pp 72-74.

[5] Callahan, H.I., Portal, A.C., Devereaux, R. and Gragi, M., An axenic amastigote system for drug screening, Antimicrob. Agents Chemother., 41 (1997) 818-823.

[6] Coombs, G.H., Craft, J.A. and Hart, D.T., A comparative study of Leishmania mexicana amastigotes and promastigotes, Enzyme activities and subcellular locations, Mol. Biochem. Parasitol., 5 (1982) 199-211.

[7] Gorgl, M., Thomason, T.N. and Franke, E.D., Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease, Am. J. Trop. Med. Hyg., 47 (1992) 117-126.

[8] Ibrahim, M.E., Hag-Ali, M. and El-Hassan, A.M., Leishmania resistance to sodium stibogluconate: drug-associated macrophage-dependent killing, Parasitol. Res., 80 (1994) 569-574.

[9] Lira, R., Sundar, S. and Makharia, A., Evidence that high incidence of treatment failures in Indian Kala-Azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of

www.SID.ir

Archive of SID

Leishmania donovani, J. Infect. Dis., 180 (1999) 564-567.
[10] Peters, B.S., Fish, D. and Golden, R., Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical feature and response to therapy, J. Med., 77 (1990) 1101-1111.
[11] Petit de pena, Y., Gallignani, M. and Burguera, Selective determination of antimony (III) and antimony (V) in blood serum and urine by hydride generation and atomic absorption spectrometry, J. Braz. Chem. Soc. 1 (1990) 72-75.
[12] Roberts, W.L., Berman, J.D. and Rainey, P.M., In vitro antileishmanial properties of tri- and penta-valent antimonial preparations, Antimicrob. Agents Chemother., 39 (1995) 1234-1239.
[13] Sereno, D. and Lemesre, J.L., Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents, Antimicrob. Agents Chemother., 41 (1997) 972-976.
[14] Sereno, D., Cavaleyra, M. and Zemzoumi, K., Axenically grown amastigotes of Leishmania infantum used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action, Antimicrob. Agents Chemother., 42 (1998) 3097-3102.
[15] Sereno, D. and Lemesre, J.L. Use of an enzymatic in vitro micromethod to quantify amastigote stage of axenically grown amastigote forms of Leishmania amazonensis, Parasitol. Res., 83 (1997) 401-403.
[16] Zijstra, E.E., Siddig Ali, M. and El-Hassan A.M., Kala-azar in diplaced people from Southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 85 (1991) 365-69.

www.SID.ir