تأثیر آلوپورینول بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ترویکا مقاوم به گلوکانتیم

دکتر منظومه شمسی میمندی*- دکتر شهریار دبیری*- میترابحرینی*

*مربی فارماکولوژی، بخش فیزیولوژی فارماکولوژی دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان

چکیده

مقدمه: هر ساله ٤٠٠٠٠٠ مورد جدید لیشمانیوز پوستی گزارش می شود و عدم پاسخگویی به درمان انتخابی (گلوکانتیم) رو به افزایش است. در صورت مقاومت دارویی، الوپورینول خوراکی نیز به درمان اضافه می شود.

هدف: در این تحقیق اثر الوپورینول بر پروماستیگونهای مقاوم به لیشمانیا ترویکا ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها: پروماستیگوتهای L.tropica در مجاورت غلظت‌های افزاینده گلوکانتیم کشت داده شد تا نوع مقاوم به ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر الوپورینول حاصل شد. پس از بررسی سیتولوژیک انواع مقاوم در هر مرحله تأثیر غلظت‌های مختلف الوپورینول بر هر دو نوع وحشی و مقاوم، با شمارش تعداد و محاسبه درصد رشد، اندازه گیری شد. سپس تفاوت این متغیرها در هر نوع و مابین دو نوع مقایسه شد.

نتایج: در انواع مقاوم ابعاد پروماستیگوتها کاهش یافته و دم آنها کوتاهتر و ضخیم تر و یا در بعضی موارد ناپدید شد. سیتوپلاسم مضرس و کینتوپلاست به هسته نزدیکتر شده بود. الوپورینول موجب کاهش درصد رشد و تعداد در پروماستیگوتهای مقاوم اولیه شد. اما درصد رشد نوع مقاوم در حضور تمام غلظتهای الوپورینول بطور معنی داری کمتر از نوع اولیه بود.

نتیجه‌گیری: مکانیسم‌های مقاومت به گلوکانتیم منجر به تغییرات مورفولوژیک و سرعت رشد در پروماستیگوت‌ها شده‌اند. الوپورینول موجب کاهش درصد رشد و تعداد در هر دو نوع شد. اما حساسیت پروماستیگوت های لیشمانیا ترویکای مقاوم آزمایشگاهی به الوپورینول بیش از انواع اولیه بوده است. این نتایج با بررسی‌های کلینیکی قبلی نیز هماهنگی دارد.

کلید واژه ها : آلوپورینول/ انگل لیشمانیای گرمسیری/ مقاومت دارویی

مقدمه

سالک از بیماریهای اندمیک منطقه کرمان می باشد و کرمان پنجمین منطقه آلوده به لیشمانیوز (نوع شهری) در ایران بشمار می رود (۲). عامل بیماریزای لیشمانیا تک یاخته ای از دسته کینتوپلاست داران می‌باشد(۱). فرم پروماستیگوت در محیط کشت ازمایشگاهی بهتر تکثیر می یابد ولی در واقع در روده پشه خاکی (فلبوم توم) زندگی کرده و تکثیر می شود و با نیش پشه از طریق بزاق به بدن میزبان انتقال یافته (۷) و در صورت ورود به ماکروفاژها و هیستوسیتها تکثیر یافته و موجب لیشمانیوز می گردد (۱۷).

سالـــک یا لیشمانیوز پوستی به دو نوع شهری با ضایعات خشک و نوع روستایی با ضایعات مرطوب تقسیم می شود. نوع شهری توسط سویه ترویکا ایجاد می شود.

ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان، گلوکانتیم و پنتوستام به عنوان داروی انتخاب اول در درمان لیشمانیوز پوستی مطرح شده اند (۵). با این وجود هر ساله ٤٠٠٠٠٠ مورد جدید گزارش می شود و عدم پاسخگویی رو به افزایش است (١٤). ماهیت مقاومت دارویی انگل دقیقا" شناخته نشده است. گذشته از انواع مقاوم در طبیعت و وجود تفاوتهای‌فارماکوکینتیک دارو در بیماران، درمانهای ناموفق مکرر نیز موجب عدم جوابگویی به درمان انتخابی می شود (۸ و۹). ترکیبات آنتی موان با وقفه گلیکولیزواکسیداسیون اسیدهای چرب

موجب مرگ انگل می شود(٦). در حالیکه الوپورینول با انحراف سنتز نوکلئوتیدهای حیاتی موجب انهدام آن می شود (١١و ١٦). ظاهراً این دو دارو مکانیسم اثر کاملا" متفاوت داشته و از مسیرهای متفاوت سیستمهای حیاتی انگل را مختل می کنند. در صورت بروز مقاومت دارویی به درمان انتخابی، از روشهای درمانی چاره‌گر مانند کرایوتراپی، ترموتراپی، و ... داروهای دیگر استفاده می شود. تجویز الوپورینول خوراکی به علت ارزانی و راحتی رو به افزایش است. بررسیهای کلینیکی نشان داده است که همراهی الوپورینول با گلوکانتیم در درمان لیشمانیوز پوستی موفق تر از گلوکانتیم به تنهایی بوده است و حتی تجویز فقط الوپورینول درصد بهبودی مشابه ای نشان داده است (١٢). در درمان L. recidivante الوپورینول با گلوکانتیم مجموعه دارویی موفقیت آمیزی ایجاد کرده که موجب بهبود حدود ٩٧٪ بیماران شده است و عوارض جانبی خاصی نیز گزارش نشده است (١٣ و ١٤). از این رو بررسی تأثیر آلوپورینول بر انواع مقاوم بصورت خارج بدن (In vitro) امری ضروری بنظر می رسد. بنابراین ابتدا انواع مقاوم به گلوکانتیم In vitro ایجاد کرده، تغییرات سیتولوژیک را بررسی و تشخیص داده سپس تأثیر آلوپورینول نیز در مراحل مختلف بررسی شد.

مواد و روش ها

سویه پروماستیگوتهای K27-Tropica در محیط کشت مایع RPMI 1640 (شرکت طوبی نگین ـ ایران) تهیه شد. داروهای مورد استفاده ،پودر خالص الوپورینول (شرکت تولید دارو حکیم ـ ایران) و گلوکانتیم (آمپول ١/٥ gr/٥ ml شرکت اسپسیا ـ فرانسه) بود.

مقاوم کردن سویه اصلی K27 به طریق آزمایشگاهی: ابتدا کشت مادر در ١٠cc محیط کشت مایع RPMI 1640 آغاز شد. این کشت پس از دو روز در انکوباتور در دمای ٢٣°c به حداکثر فعالیت خود رسید. مشاهده با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×١٠، دسته های تقسیم یا Rossette نشان می داد. رنگ محیط از صورتی کمرنگ به زرد روشن تغییر یافت. این دو پدیده حاکی از آغاز مرحله فعال رشد می باشد. در این مرحله، تعداد پروماستیگوتها توسط لام نئوبار شمارش و غلظت ان حدود ١/٦×١٠^٦ در میلی لیتر بود. ١/٥ میلی لیتر از محیط کشت مادر را با دور ٥٠٠ g/sec به مدت ١٥ دقیقه سانتریفوژ گردید. (سانتریفوژ clemente 2000) این عمل جهت بالابردن غلظت کشت بدون از بین رفتن انگل انجام شد. مشاهده توسط میکروسکوپ نوری حاکی از این بود که در قسمت بالا تعداد کمی انگل و قسمت عمده انگلها در انتهای لوله قرار داشت. با تهیه لام و رنگ آمیزی گیسما از دو قسمت اطمینان حاصل گردید که سانتریفوژ موجب تخریب و تغییر ساختمانی انگل نشده است. لازم به تذکر است که این دور سانتریفوژ و مدت آن پس از آزمایشات مکرر بطور تجربی حاصل شده است و سابقه در تحقیقات قبلی ندارد.

سپس قسمت بالایی تخلیه گردید و محیط کشت و محلول دارویی گلوکانتیم را طوری اضافه کردیم که غلظت گلوکانتیم در محیط به ١ میلی گرم بر میلی لیتر برسد، جهت کنترل ،مقداری از آن را در لوله جداگانه ای نگهداری کردیم. پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ٢٣ درجه سانتیگراد، انگلهای پاساژ اول (که T1 نامگذاری شد) فعال و رنگ آن زرد روشن شد که از آن ٥ لام توسط

گیسما رنگ آمیزی شد. برای پاساژ دوم و دستیابی به T2 ، مانند قبل T1 را سانتریفوژ کرده و به آن محیط کشت تازه و گلوکانتیم اضافه کردیم. رشد در مجاورت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر گلوکانتیم انجام شد، جهت کنترل برگشت مقداری از آن با نام T2 در لوله جداگانه نگهداری کردیم. پس از دو روز انکوباسیون در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد ، ۵ لام تهیه و پاساژ سوم انجام شد. بدین ترتیب کشت T3 در مجاورت غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر رشد کرده بود.

به همین ترتیب T4 در مجاورت ١٤ میلی گرم بر میلی لیتر، T5 در مجاورت ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر، T6 در مجـــــــاورت، ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، T7 در مجاورت ٨٤ میلی گرم بر میلی لیتر، T8 در مجاورت ۱۱۲/۵ میلـــی گرم بر میلی لیتر ، T9 در مجاورت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، T10 در مجاورت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر گلوکانتیم رشد کردند. لازم به تذکر است که مانند قبل از هر پاساژ ۵ لام جهت بررسی سیتولوژیک تهیه و جهت کنترل برگشت و جمع آوری اطلاعات برای تحقیقات آینده در لوله ای جداگانه نگهداری شد. بدین ترتیب سویه مقاوم به ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر گلوکانتیم که آن را نوع مقاوم RT (Resistant Type) می نامیم، حاصل شد.

کشت RT در مجاورت الوپورینول:

آلوپورنیول به علت ساختمان شیمیایی اش در سود ۰/۱N محلول است در یک بررسی ابتدائی این غلظت سود تمامی انگل های لیشمانیای کشت شده را از بین می برد غلظتهای کمتر تا ۰/۰۱N نیز موجب تخریب سلولی انگل لیشمانیا شد. لذا سعی کردیم با کمک اسیداستیک آلوپورینول را حل کنیم ولی اسید استیک نیز حتی در غلظتهای پایین، بهتر از سود نبود. پس با توجه به غلظتهای پایین آلوپورینول که در این طرح مورد نیاز است (۳)، از محلول فیزیولوژیک که آسیبی به محیط کشت نمی رساند استفاده شد.

محلول۲mg/mlآلوپورینول در محلول فیزیولوژیک به کمک بن‌ماری وهمزن تهیه شد.میانگین پنج شمارش ازکشتRT حاکی‌ازغلظت ml/ $۳/۲\times۱۰^{۶}$ پروماستیگوت بوده لذا در محیط کاملا″ استریل شش لوله آزمایش حاوی ۱cc کشتRT قرار دادیم.

در لوله اول فقط ۱cc محلول فیزیولوژیک و در لوله های بعدی محلول آلوپورینول و محلول فیزیولوژیک طوری اضافه شد که حجم نهایی هر شش لوله ۲ میلی لیترباشد در حالیکـــه غلظت آلوپورینول بترتیب ۰ ، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ ،۰/۰۵ و۰/۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر باشد غلظت پروماستیگوتها قبل از انکوباسیون طی پنج شمـــارش حدود $۱/٦\times۱۰^{٦}$ میلی لیتر بود . لوله‌ها ٤٨ ساعت در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد انکوبه گشتند و جهت تثبیت ٤٨ ساعت در یخچال نگهداری شدند. سپس از هر لوله پنج شمارش انجام شد تا تعداد و غلظت انگلها که در مجاورت غلظتهای مختلف آلوپورینول رشد کرده‌اند تعیین شود.

کشت نوع اولیه یا WT (Wild Type) در مجاورت آلوپورینول:

مانند کشت RT ابتدا شمارش اولیه انجام شد تا غلظت پروماستیگوتهای اولیه WT مشابه RT باشد(حدود $۱/٦\times۱۰^{٦}$ در میلی لیتر). سپس شش لوله را با روش قبلی در مجاورت غلظتهای مذکور آلوپورینول کشت داده ایم و شمارش نهایی انجام شد. محاسبه درصد رشد بر اساس فرمول زیر انجام می شد.

$$\text{درصد رشد در هر غلظت آلو پورینول} = \frac{\text{تعداد انگل در غلظت ۰ - تعداد انگل هر غلظت}}{\text{تعداد انگل در غلظت}} \times ۱۰۰$$

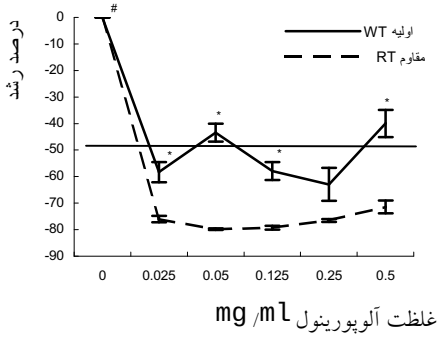
برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری t-test و آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شده است.

نتایج

تأثیر آلوپورینول بر WT و RT و مقایسه آن:

WT با غلظت اولیه $۱۰^{۶}$ × (۰/۰۱ ±۱/٦٥) در میلی لیتر انکوبه شد. پس از ٤٨ ساعت تعداد آن $۱۰^{۶}$×(۰/۲۸۲ ±۲/۸۹۷) در میلی لیترشد.

تعداد انگلها (۱۵±۷۵) درصد افزایش یافت. حضور فقط ۰/۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر آلوپورینول بطور معنی داری موجب کاهش تعداد انگل شد (P=0.000). غلظتهای بالا نیز موجب کاهش معنی داری (P<0.01) در تعداد انگل نسبت به غلظت صفر باشد. اما بین غلظتهای مختلف تفاوتی مشاهده نشد (جدول ۱ نمودار ۱).



نمودار ۱: درصدرشد پروماستیگونهای مقاوم (RT) و اولیه (WT) بطورمعنی‌داری‌درحضورالوپورینول‌کاهش یافت. در غلظتهای۰/۰۲۵٪،۰/۰۵٪،۰/۱۲۵٪و۰/۵میلی‌گرم‌برمیلی‌لیترالوپورینول، درصد رشد (RT) بطور معنی‌داری کمتر از (WT) بود.

*** اختلاف معنی دار بین گروه (WT) و (RT)**
(P<0.01)

 # اختلاف معنی دار با تمام غلظتهای الوپورینول(P<0.01)

درصد رشد WT نیز در حضور حتی ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر آلوپورینول بطور معنی داری کاهش یافت (P=0.000) . این کاهش در غلظتهای بالاتر نیز مشاهده می شود اما بین غلظتهای مختلف تفاوتی نیست (نمودار ۲).

رشدRT درمحیط کشت‌سریع‌ترازWT بود. بطوری که بدون حضور دارو و تعداد انگلها (٤±۱۸۰) درصد افزایش داشت. تعداد و کاهش درصد رشد در انگلهای مقاوم نیز بطور معنی داری تحت تأثیر آلوپورینول قرار گرفت (P=0.000). اما غلظتهای مختلف آلوپورینول تغییری در کاهش درصد رشد و تعداد انگلها ایجاد نکرد. (جدول ۲ و نمودار ۱ و ۲).

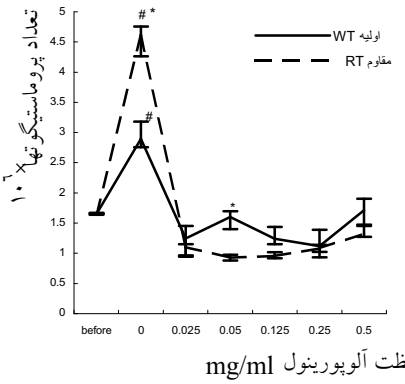
مقایسه بین RT وWT نشان می دهد که بدون حضور الوپورینول (غلظت صفر)، تعداد سویه مقاوم $۱۰^{۶}$×(۰/۱٦ ±٤/٥٩) در هر میلی لیتر بوده، در حالیکه تعداد سویه اولیه بطور معنی داری کمتر بود. $۱۰^{۶}$×(۰/۲۸±۲/۸۹) در هر میلی لیتر (P=0.0001) (جدول ۱ و ۲). همچنین در غلظت ۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر آلوپورینول نیز تعداد انگلهای مقاوم بطور معنی داری کمتر از انگلهای اولیه بود (P=0.000) (نمودار ۱). درصد رشد RT در حضور تمام غلظتهای الوپورینول بطور معنی‌داری کمتر از سویه اولیه بود (P<0.01) (نمودار ۲).

جدول ۱: تعدادپروماستیگوتهای سویه اولیه WT($\times 10^6$) در یک میلی لیتر محیط حاوی آلوپورینول

شمارش / غلظت آلوپورینول mg/ml	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	میانگین±SE
۰	۱/۸۳	۲/۹۲۰	۳/۰۰۵	۳/۳۵۰	۳/۳۸۰	۲/۸۹ ±۰/۲۸
۰/۰۲۵	۰/۵۵۰	۱/۰۳۵	۱/٤۰۰	۱/٥٦۰	۱/٦۸٥	۱/۲٥ ±۰/۲۱
۰/۰٥	۱/۲۷٥	۱/٥۱۰	۱/٦۹۰	۱/۷٤۰	۱/۷۹٥	۱/٦۰±۰/۰۹
۰/۱۲٥	۰/٦۹۰	۱/۰٥٥	۱/۱۹۰	۱/٤۱۰	۱/۸٦۰	۱/۲٤±۰/۱۹
۰/۲٥	۰/٤۷۰	۰/٦۷٥	۱/۰۲٥	۱/٥۰٥	۱/۹۳۰	۱/۱۲±۰/۲۷
۰/٥	۱/۳٥٥	۱/۳۸٥	۱/٦۰۰	۱/۸٤۰	۲/۳۸۰	۱/۷۱±۰/۱۹
قبل از کشت	۱/٦۳	۱/٤۷	۱/٤۹	۱/٦۰	۱/٦٥	۱/٦٥±۰/۰۱

جدول ۲: تعدادپروماستیگوتهای سویه مقاوم RT ($\times 10^6$) در یک میلی لیتر محیط حاوی آلوپورنیول

شمارش / غلظت آلوپورینول mg/ml	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	میانگین±SE
۰	٤/۰۷۰	٤/٤٦۰	٤/۷۲۰	٤/۷۷۰	٤/۹۸۰	٤/٥۹ ±۰/۱٦
۰/۰۲٥	۰/۹۹٥	۱/۲۰۰	۱/۲٤۰	۱/۰۳٥	۱/۰۳٥	۱/۱۰±۰/۰٥
۰/۰٥	۰/۸۰٥	۰/۹۰۰	۰/۹۲۰	۰/۹٥٥	۱/۰۷۰	۰/۹۳±۰/۰٤
۰/۱۲٥	۰/۸۳٥	۰/۸۸۰	۰/۸۸٥	۱/۰۳٥	۱/۱٥	۰/۹٦±۰/۰٦
۰/۲٥	۰/۸۸٥	۱/۰۷٥	۱/۰۸	۱/۱٦	۱/۲۱٥	۱/۰۸±۰/۰٦
۰/٥	۰/۹۷٥	۱/۰۹	۱/۲۱	۱/٦٦٥	۱/٦۹	۱/۳۲±۰/۱٥
قبل از کشت	۱/٥۳	۱/٦۹	۱/۷۳	۱/٦۱	۱/٦۲	۱/٦٤±۰/۰۳



نمودار۲:الوپورینول‌موجب‌کاهش‌تعداد درپروماستیگوتهای مقاوم (RT) و همچنین اولیه(WT) شده است. تعداد پروماستیگوتهای‌مقاوم(RT) درتمامی غلظتهای‌الوپورینول کمتر از اولیه (WT)بوده است
اما فقط در غلظت mg/ml ۰/۰۵ الوپورینول این اختلاف معنی دار شده است.
***اختلاف معنی‌دار بین گروه (WT) و(RT)(P<0.01)**
 # اختلاف معنی‌داربا‌تمام‌غلظتهای‌الوپورینول (P<0.01)

بررسی سیتولوژیک:

لامهای تهیه شده از کشت T1 : دژنرانس آبکی دور هسته‌ای همراه با نازک شدن قسمت انتهای انگل و پیدایش پراکنده گرانولهای قهوه‌ای ریز داخل سیتوپلاسمی تاژک، کینتوپلاست هسته ظاهراً طبیعی بود.

لامهای تهیه شده از کشتT2 : خیز دور هسته‌ای همراه با پیدایش گرانولهای سیتوپلاسمی و در بعضی انواع از دست دادن یا کوتاه شدن تاژک مشاهده شد.

لامهای تهیه شده از کشتT3 : تاژک کوتاه و ضخیم شده بود، گرانولهای سیتوپلاسمی وجود داشتند. در بعضی انواع آتروفی پروماستیگوت مشاهده شد.

لامهای تهیه شده از T4: غشای سیتوپلاسمی مضرس شده، کینتوپلاست به هسته نزدیکتر شده و تـــاژک همچنان کوتـــاه و ضخیـــم‌تر شده بود. گرانولهای داخل سیتوپلاسم افزایش یافته بود.

لامهای تهیه شده از کشتT5 : غشای سیتوپلاسمی مضرس شده کینتوپلاست به هسته نزدیک بوده تاژک کوتاه تر و ضخیم تر شد. گرانولهای داخل سیتوپلاسم افزایش یافته بودند.

لامهای تهیه شده ازT6, T7, T8 : مشاهدات T5 تکرار شده و اندازه انگل بنظر کوچکتر شده بود.

لامهای تهیه شده ازT9 : آتروفی و کوچک شدن انگل همراه با فاصله دار شدن تاژک از کنیتوپلاست مشاهده شد.

لامهای تهیه شده ازT10 : دیواره سیتوپلاسمی مضرس و ضخیم- تاژک کوتاه و ضخیم ، همراه با تغییرات دژنراتیو هسته دیده شد (نمودار۱).

بحث و نتیجه گیری

آلوپورینول خوراکی روش درمانی آسان و مقرون به صرفه ای می باشد.تحقیقات کلینیکی نشان داده است که هم به عنوان درمان کمکی با گلوکانتیم و هم به تنهایی در درمان سالک مؤثر بوده است. در انواع مقاومی که به گلوکانتیم پاسخ نمی دهند، آلوپورینول نتایج مطلوبی داده است (۴،۱۲،۱۳). در این تحقیق نیز انواع مقاوم آزمایشگاهی بطور معنی داری تحت تأثیر الوپورینول قرار گرفته اند وهم‌درصدرشدوهم‌تعداد انگلها کاهش یافته است. این کاهش رشد از همان ابتدا و در غلظتهای بسیار پایین الوپورینول مشهود است. پس از آن در هر دو نوع افزایش الوپورینول تغییر محسوسی در روند رشد ایجاد نمی کند. بطوری که افزایش حتی ۲۰ برابر غلظت آلوپورینول روند رشد RT را کاهش نمی دهد. در غلظت ۰/۰۲۵ میلی گرم برمیلی‌لیتر کاهش درصد رشد RT (۱/۲۱±۷۵/۹۸) بوده و در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر کاهش درصد رشد (۲/۴۲/±۷۱/۴) می باشد. افزایش ۲۰ برابر غلظت آلوپورینول در روند رشد WT نیز کاهش معنی دار ایجاد نکرده است. بطوریکه در غلظت ۰/۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر درصد رشد (۳/۸۰ ±۵۸/۳۰) و در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر درصد رشد (۵/۱۷±۳۹/۹۹) کاهش می یابد.

آلوپورینول خوراکی که در درمان لیشمانیوز پوستی تجویز می شود غلظت مؤثری برابر ۴/۵ میلی گرم بر میلی لیتر را در سرم ایجاد می کند که قادر به کاهش رشد اماستیگوت ها می باشد(۳). اما در این تحقیق به جرأت می توان گفت حداقل غلظت ۰/۰۲۵ میلی گرم در میلی لیتر در هر نوع WT,RT بیش از ۵۰٪ رشد پروماستیگونها را کاهش داده است. سویه مقاوم در این غلظت (۱±۷۶)٪ کاهش رشد و سویه اولیه (۳±۵۶)٪ کاهش رشد داشته است (نمودار۱). با توجه به

اینکه غلظتهای کمتر از ۰/۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بـــــررسی نشده است Ec50 در هر دو نـــوع احتمالا" کمتر از ۰/۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد.

بیماریزایی انگل با تکثیر فرم اماستیگوت در ماکروفاژها شروع می شود(۱۷). داروهای ضد لیشمانیوز بایستی بر این فرم مؤثر باشند. با وجودیکه فرم اماستیگوت و پروماستیگوت از نظر ژنتیکی یکسان می باشند. اما از نظر سیتولوژیک و مرفولوژیک متفاوت هستند. از نظر فارماکولوژیک نیز، تحقیقات قبلی حاکی از تفاوت حساسیت اماستیگوت و پروماستیـــگوت به داروهـــای ضد لیشمانیوز می باشد(۱۰ و ۱۵).

در این تحقیق در طی فرآیند مقاوم شدن به گلوکانتیم، کاهش ابعاد انگلها همزمان با افزایش سرعت رشد مشاهده می شود. با توجه به مکانیزم اثر گلوکانتیم، احتمال می رود که اکسیداسیون اسیدهای چرب و گلیکولیز در انواع مقاوم تغییر یافته باشد. لذا نیاز سلول به انرژی تغییر می یابد. این تغییرات بصورت کاهش ابعاد و افزایش رشد پدیدار می شود. اما این پدیده موجب کوتاهی و ضخیم شدن تاژکها و در نتیجه کاهش حرکت پروماستیگوتها نیز شده است و احتمالا" امکان اثر داروی دوم بدین علت افزایش می یابد. مکانیسم اثر الوپورینول، انحراف سنتز نوکلئوتیدهای حیاتی و در نتیجه مرگ سلول می باشد(۱۱ و ۱٦). این مکانیسم با عملکرد گلوکانتیم کاملاً تفاوت دارد (٦). این دو دارو از راههای بیوشیمیکی متفاوتی اثر می کنند. به همین دلیل الوپورینول موجب کاهش درصد رشد و تعداد در دو نوع WT,RT شده است اما درصد رشد RT به علت تغییرات مرفولوژیک و سیتولوژیک فوق الذکر در تمام غلظتهای مورد آزمایـــش بطور معنـی داری کمتر WT از بوده است.

با این متد، که الگوی آزمایشگاهی درمانهای مکرر و ناموفق لیشمانیوز می باشد، به این نتیجه رسیدیم که الوپورینول موجب انهدام هر دو نوع پروماستیگونهای اولیه و مقاوم شده است مهمتر آنکه تأثیر آن بر پروماسیتگوتهای مقاوم بیش از اولیه بوده است. در بررسیهای کلینیکی نیز الوپورینول در بهبودی لیشمانیوز مقاوم نتایج مشابه ای داده است (۱۲، ۱۳ و ۱٤). بدیهی است که بررسی های بیشتری در زمینه بیماری زایی در RT در سلولهای انسانی روشنگر مکانیسمهای مقاومت داروئی و تغییرات سیتولوژیک و بخصوص تغییرات ایمونولوژیک انواع مقاوم خواهد بود.

سپاسگزاری:

نویســـنـــده از: معاونت پژوهشـــی دانشـگاه علوم پزشکی کرمان که هزینه های مربوطه را متقبل نموده اند سپاسگزاری می کند.از همکاری خانم آذری که تایپ و صفحه بندی مقاله را انجام داده اند، همچنین از پرسنل بخش پاتولوژی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی کرمان صمیمانه سپاسگزار است.

منابع

۱- ا ردهالی، ص؛ رضایی، ح؛ ندیم، ا: انگـــل لیشمانیا و لیشمانیوز. تهران: مرکز نشر دانشگاهی، ۱۳٦٤، صص: ٦-۱.

۲- ندیم، ابوالحسن؛ حدادیان،عزت الدین؛ سید دشتی، محمدعلی: همه گیرشناسی لیشمانیوزها در ایران، انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها. تهران: مرکز نشر دانشگاهی، ۱۳٦٤، صص:۱۷۵-۱۵۰.

3. Allopurinol Ribonucleoside: Information for Clinical Investigators. Research, Triangle paok, NC: Burroughs Wellcome, 1984: 3-12.

4. Belloli C, Ceci Li Cartis, Tassi P, Montesissa C, De Natale G. Disposition of Antimony and Aminosidine in Dogs after Administration Separately and Together: Implication of Therapy of Leishmaniasis. Rev Vet Sci 1995 : 58 (2): 123-127.

5. Berman JD. Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochimical Mechanisms, Clinical Efficacy, and Future Strategies. Rev Infect Dis 1988: 10: 560-80.

6.Berman D, Edwards N, king M, Grogl M. Biochemistry of Pentostam Resistant Leishmania. Am J Trop Hyg 1989: 40(2):159-164.

7.Gerald D, Schmidt M, Larry SR. Foundations of parasitology. New york: Mosby, 1977:7.

8. Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S. Decreased Sensitivity to Meglumine Antimoniate (Glucantime) of Leishmania Infantum Isolated from Dogs after Several courses of drug treatment. Ann Trop Med Parasitol 1992: 89 (6): 613-620.

9.Grogl M, Thomason TN, Framke ED. Drug Resistance in Leishmaniasis: its Implication in Systemic Chemotherapy of Cutaneous and Mucocutaneous Disease. Am J Trop Med Hyg 1992: 47(1): 117-126.

10.Ibrahim ME, Hag-Ali M, el-Hassan AM, Theander TG,Kharazmi A. Leishmania Resistant to Sodium Stibogluconate: Drug-Associated Macrophage- Dependent Killing. Parasitol Res1994: 80(7):569-574.

11.Marr JJ, Benens RL. Antileishmanial Effect of Allopurinol. II.Relationship of Adenine Metabolism in Leishmania Species to the Action of Allopurinol. J Infect Disease 1997: 136(6):724-731.

12.Martinez S, Marr JJ. Allopurinol in the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis.Engl J Med 1995: 326 (11): 741-742.

13.Momeni AZ, Aminjavaheri M. Treatment of Recurrent Leishmaniasis. Int J Dermatol 1995:34(2):129-133.

14.Quellette M, Papadopoulov B. Mecchanisms of Drug Resistance in Leishmania. Parasitol Today 1993: 9(5): 150-153.

15.Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial Activity of Sodium Stibogluconate Fractions. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1993: 37(9): 1842-1846.

16.Saenz Re, Paz HM, Johnson CM. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Orally Administered Allopurinol riboside. J Infect Dis 1989 160:153-158.

17. WHO. Control of the Leishmaniasis. Geneva: WHO, 1990: 9-35.

Effects of Allopurinol on Leshman Tropica Resistant Types

Shamsi Meymandi M, Dabiri Sh, Bahreini M.

Abstract

Introduction: 400000 new cases of cutaneous Leishmaniasis are reported each year and unresponsiveness to treatment of choice (Glucantim) is increasing. In cases of drug resistance, Allopurinol is prescribed as alternative therapy.

Objective: In this in vitro study Allopurinol effects were assessed on L. Tropica resistant Types.

Materials and Methods: The L. Tropica Promastigote species were cultured in increasing concentrations of Glucantim to obtain the resistant type to 250 mg/ml. After cytological evaluation of all resistant types, Allopurinol effects were measured by count and by growth percentage of both wild and resistant types. The differences of these variables were then compared in and between species.

Results: Promastigotes of resistant type were decreased in dimension, their tails got thicker and shorter or even disappeared, and cytoplasm got dentate while kinetoplast moved next to nucleus. Allopurinol decreased growth percentage and the number of both resistant and wild Promastigotes. But growth percentage of resistant type was significantly less than Wild type for all Allopurinol concentrations.

Conclusion: Mechanisms of Glucantim resistance lead to morphological and growth rate changes. In agreement to precedent clinical studies the in vitro resistant type of L. Tropica Promastigotes were more sensitive to Allopurinol, although Allopurinol is effective on both wild and resistant species.

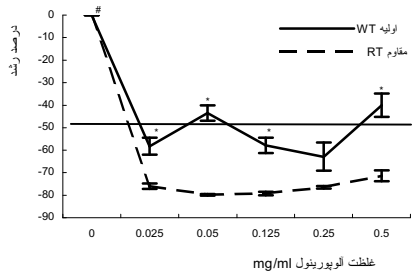
Key word: Allopurinol/ Drug Resistance/ Leishman Tropica

جدول ۱: تعدادپروماستیگوتهای سویه اولیه WT(10^6×) در یک میلی لیتر محیط حاوی آلوپورینول

شمارش / غلظت آلوپورینول mg/ml	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	میانگین±SE
۰	۱/۸۳	۲/۹۲۰	۳/۰۰۵	۳/۳۵۰	۳/۳۸۰	۲/۸۹ ±۰/۲۸
۰/۰۲۵	۰/۵۵۰	۱/۰۳۵	۱/٤۰۰	۱/٥٦۰	۱/٦۸٥	۱/۲٥ ±۰/۲۱
۰/۰٥	۱/۲۷٥	۱/٥۱۰	۱/٦۹۰	۱/۷٤۰	۱/۷۹٥	۱/٦۰±۰/۰۹
۰/۱۲٥	۰/٦۹۰	۱/۰٥٥	۱/۱۹۰	۱/٤۱۰	۱/۸٦۰	۱/۲٤±۰/۱۹
۰/۲٥	۰/٤۷۰	۰/٦۷٥	۱/۰۲٥	۱/٥۰٥	۱/۹۳۰	۱/۱۲±۰/۲۷
۰/٥	۱/۳٥٥	۱/۳۸٥	۱/٦۰۰	۱/۸٤۰	۲/۳۸۰	۱/۷۱±۰/۱۹
قبل از کشت	۱/٦۳	۱/٤۷	۱/٤۹	۱/٦۰	۱/٦٥	۱/٦٥±۰/۰۱

جدول ۲: تعدادپروماستیگوتهای سویه مقاوم RT (10^6×) در یک میلی لیتر محیط حاوی آلوپورنیول

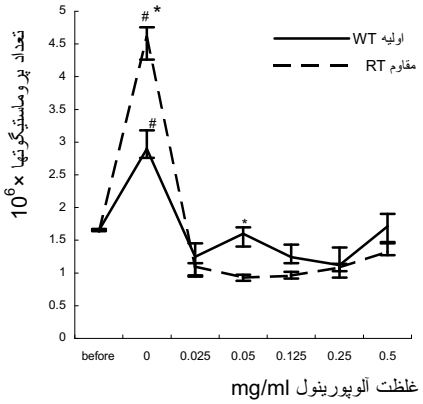
شمارش / غلظت آلوپورینول mg/ml	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	میانگین±SE
۰	٤/۰۷۰	٤/٤٦۰	٤/۷۲۰	٤/۷۷۰	٤/۹۸۰	٤/٥۹ ±۰/۱٦
۰/۰۲٥	۰/۹۹٥	۱/۲۰۰	۱/۲٤۰	۱/۰۳٥	۱/۰۳٥	۱/۱۰±۰/۰٥
۰/۰٥	۰/۸۰٥	۰/۹۰۰	۰/۹۲۰	۰/۹٥٥	۱/۰۷۰	۰/۹۳±۰/۰٤
۰/۱۲٥	۰/۸۳٥	۰/۸۸۰	۰/۸۸٥	۱/۰۳٥	۱/۱٥	۰/۹٦±۰/۰٦
۰/۲٥	۰/۸۸٥	۱/۰۷٥	۱/۰۸	۱/۱٦	۱/۲۱٥	۱/۰۸±۰/۰٦
۰/٥	۰/۹۷٥	۱/۰۹	۱/۲۱	۱/٦٦٥	۱/٦۹	۱/۳۲±۰/۱٥
قبل از کشت	۱/٥۳	۱/٦۹	۱/۷۳	۱/٦۱	۱/٦۲	۱/٦٤±۰/۰۳


درصد رشد
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
#
*
WT اولیه
RT مقاوم
0
0.025
0.05
0.125
0.25
0.5
غلظت آلوپورینول mg/ml

نمودار۲: الوپورینول موجب کاهش تعداد در پروماستیگوتهای مقاوم (RT)و همچنین اولیه(WT) شده است
تعداد پروماستیگوتهای مقاوم (RT)در تمامی غلظتهای الوپورینول کمتر از اولیه (WT)بوده است
اما فقط در غلظت۰/۰۵ mg/ml الوپورینول این اختلاف معنی دار شده است.

* اختلاف معنی دار بین گروه (WT) و (RT) (P<0.01)

اختلاف معنی دار با تمام غلظتهای الوپورینول (P<0.01)


تعداد پرومایلوسیتگرانولها $\times 10^6$
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
before
0
0.025
0.05
0.125
0.25
0.5
WT اولیه
RT مقاوم
غلظت آلوپورینول mg/ml