

## بررسی تأثیر دیسک های دارویی پارامومايسين و جنتامایسین سولفات بر رشد پروماستیگوت های انگل لیثمانیا

دکتر سید حسین حجازی<sup>۱</sup>، سپیده طلوعی<sup>۲</sup>، دکتر علی اصیلان<sup>۳</sup>، دکتر محمد شاطالی<sup>۳</sup>، مهیار مستقیم<sup>۲</sup>  
دکتر گیتی صادقیان<sup>۴</sup>

### چکیده

سابقه و هدف: نظر به شیوع و هیپراندمیک بودن بیماری لیثمانیوز در بعضی مناطق کشور و مشکلات درمانی سالک و وجود بعضی گزارشات از موفقیت پارامومايسين در درمان بیماری و به منظور تعیین تأثیر کشندگی شکل فیزیکی جدیدی از این دارو بر روی پروماستیگوت های لیثمانیا ماژور، این تحقیق در شرایط برون تنی انجام گرفت.

مواد و روش ها: تحقیق به روش EXPERIMENTAL انجام گرفت. فیلم های دارویی حاوی ۱۵ درصد پارامومايسين سولفات و ۰/۵ درصد جنتامایسین سولفات در پایه ای از اتیل سلولز و HPMC (هیدروکسی - پروپیل - متیل - سلولز) با هدف ابداع یک راه درمانی برای لیثمانیوز جلدی تهیه گردید. به منظور بررسی چگونگی آزاد شدن دارو و تأثیر آن بر انگل های محیط کشت از روش Cloning انگل Leishmania بر روی محیط N.N.N اصلاح شده بدون فاز مایع رویی استفاده گردید تا بتوان به دقت هاله عدم رشد انگل را در اطراف نواحی مربوط به آزاد شدن دارو مورد بررسی قرار داد. محیط های مورد بررسی شامل، محیط های حاوی دیسک دارویی، محیط های بدون دیسک دارویی و محیط های دارای دیسک پلاسبو بود و میزان کشندگی آن با آماره کای دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته ها: در پلیت های فیلم های دارویی هاله ای از عدم رشد کولونی های انگل مشاهده گردید. به صورتی که در شعاع ۳ سانتی متری اطراف فیلم دارویی هیچ ناحیه رشد انگل وجود نداشت و یا پروماستیگوت های انگل به صورت مرده و دژنره شده مشاهده گردید. حال آنکه در تمام سطوح محیط کشت های حاوی پلاسبو و محیط فاقد فیلم کولونی های در حال تکثیر انگل مشاهده گردید. درصد انگل های مرده به زنده در پلیت های پلاسبو و فاقد دارو ۹۸ درصد و در گروه دارویی ۵ درصد بود ( $P < 0/000$ ).

نتیجه گیری و توصیه ها: دیسک های دارویی پارامومايسين و جنتامایسین سولفات، پتانسیل مناسبی برای رهاسازی تدریجی دارند و موثر بر رشد انگل هستند، لذا می توان انتظار داشت که این آزاد شدن تدریجی بر روی زخم های انسانی نیز برقرار باشد و انجام آن را توصیه می نماید.

واژگان کلیدی: Cloning, In Vitro, Leishmania, Paromomycin

۱- گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی

۳- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی

۴- متخصص پوست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

## مقدمه

انگل *Leishmania* دارای گونه‌های متعدد بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا می‌باشد. تاکنون بیش از ۲۰ گونه بیماری‌زا برای انسان گزارش شده است (۱) تظاهرات بالینی ایجاد شده توسط گونه‌های مزبور طیف وسیعی را شامل می‌شود. فرم جلدی لیشمانیوز بیشترین فراوانی را دارد و تخمین زده می‌شود که هر سال ۱/۵ میلیون مورد جدید بیماری توسط گونه‌های مختلف *Leishmania* در مناطق گوناگون جهان ایجاد می‌شود (۲). این نوع بیماری در مقایسه با دو شکل دیگر آن در افراد عادی مرگ و میر یا معلولیتی ایجاد نمی‌کند. اما به دلایل گوناگون از جمله طولانی بودن دوره بیماری، ایجاد ظاهر ناخوشایند و اضافه شدن عفونت‌های ثانویه باید تحت کنترل قرار گیرد. مهم‌ترین راه درمانی که امروزه برای انواع لیشمانیوزها به کار می‌رود استفاده از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان می‌باشد (۳) ولی چون مواردی از بیماری به این دارو مقاوم بوده و به درمان پاسخ نمی‌دهند و به علت وجود عوارض متعدد دارو، تلاش برای دستیابی به اشکال دارویی جدید که بتواند ضمن اینکه زخم را سریع‌تر بهبود می‌بخشد، کم‌ترین عوارض جانبی را داشته باشد و پس از بهبودی جوشگاهی بر جای نگذارد ادامه دارد (۳).

پاراموئاسین از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی است که با مکانیسم مهار سنتز RNA و تغییرات لیپیدهای قطبی غشایی و سیالیت غشاء، اثر بازدارنده بر بقای انگل *Leishmania* دارد و می‌تواند موجب مرگ انگل گردد (۴) در این زمینه مطالعات مختلفی تأثیر پاراموئاسین را بر روی پروماستیگوت انگل *Leishmania* در شرایط برون تنی مشخص نموده است (۵ و ۶) و نتایج مثبتی در زمینه تأثیر دارو بر

روی انگل در این شرایط به دست آمده است. با توجه به تهیه فیلم‌های دارویی حاوی ۱۵ درصد پاراموئاسین سولفات و ۰/۵ درصد جنتامایسین سولفات جهت مشخص نمودن چگونگی آزاد شدن دارو، طول مدت آزاد شدن دارو از فیلم و اثرات بیولوژیک دارو بر انگل در شرایط برون تنی این مطالعه طراحی گردید و اثرات آن بر تکثیر پروماستیگوت انگل در پلیت‌های حاوی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

تحقیق با طراحی EXPERIMENTAL انجام گرفت. از سویه استاندارد *Leishmania major* کد MRHO/IR/75/ER استفاده گردید. انگل از محیط استوک به درون محیط N. N. N اصلاح شده منتقل شد تا به حد کفایت رشد کند. مناسب‌ترین مرحله انگل در محیط کشت برای نگهداری آن در شرایط زنده و انجام فاز لگاریتمی انگل می‌باشد لذا غلظتی از انگل به میزان  $1 \times 10^6$  پروماستیگوت در هر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس به میزان ۸ تا ۱ درصد گلیسرول استریل به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن محتویات فوق داخل ویال‌های اپندورف در حجم ۱ میلی‌لیتر تقسیم شد و به صورت تدریجی منجمد شد. به این صورت که ابتدا ویال‌ها به درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و پس از آن به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از آن به فریزر ۹۶- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. هر بار برای انجام مطالعه و آزمایشات لازم یکی از ویال‌ها از فریزر خارج شده و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد ذوب شد و برای تکثیر پروماستیگوت‌ها به محیط‌های تازه انتقال می‌یافت. به منظور تکثیر و تطابق انگل *Leishmania* پلیت‌های حاوی محیط کشت Nicole

پروماستیگوت‌ها در سطح پلیت وجود داشت توزیع انگل‌ها بر حسب وضعیت حیات به تفکیک نوع پلیت در جدول شماره ۱ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که از هر ۱۰۰ پروماستیگوت شمارش شده در پلیت‌های حاوی دیسک دارونما و بدون دیسک، تعداد ۹۸ عدد در حال فعالیت بوده و ۲ درصد انگل‌ها، حیات خود را از دست داده بودند. این وضعیت در پلیت‌های حاوی فیلم دارویی معکوس بود و کمتر انگل زنده‌ای به چشم می‌خورد. به طوری که نسبت انگل‌های مرده یا دژنره شده حدود ۹۵ درصد پروماستیگوت‌ها را تشکیل می‌داد. نسبت‌ها بین پلیت‌های حاوی دیسک داروئی با دو پلیت حاوی دیسک حاوی پلاسبو و شاهد معنی‌دار بودن اختلاف رشد و حیات را نشان داد ( $P < 0/0001$ ). ولی این آزمون بین گروه پلاسبو و شاهد اختلاف نداشت (N.S). از طرف دیگر نسبت رشد و زنده ماندن انگل‌ها در پلیت‌های حاوی دیسک پلاسبو و پلیت‌های شاهد حدود ۲۰ برابر گروه داروی مؤثر بوده است.

جدول ۱- توزیع انگل‌های لیشمانیا بر حسب حیات و

به تفکیک نوع پلیت

نوع پلیت	وضعیت حیات انگل	مرده (درصد)	زنده (درصد)
پلاسبو		۲	۹۸
فاقد داروئی		۲	۹۸
داروئی		۹۵	۵

#### بحث

تحقیق نشان داد که پروماستیگوت‌های کشت داده شده در پلیت‌های حاوی دیسک داروئی پس از مدت ۱ هفته تا حدود ۹۵ درصد به صورت مرده و دژنره شده یافت می‌شوند. در مطالعه El-On پروماستیگوت‌های انگل Leishmania در محیط

Navy Neal (N.N.N) اصلاح شده تهیه شد. پروماستیگوت‌های کشت شده پس از شمارش با محیط مایع RPMI 1640 رقیق شدند. با استفاده از سمپلر پروماستیگوت‌های رقیق شده به درون پلیت‌های حاوی محیط کشت ریخته شدند و به صورت اسمیر در سطح پلیت گسترش یافتند.

دور پلیت با پارافیلیم بسته شد و در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۱۰ تا ۱۴ روز سطح پلیت به منظور بررسی وجود کولونی انگل مورد آزمایش قرار گرفت. با تأیید توان تکثیر انگل در چنین محیطی در مرحله بعدی مطالعه، انگل از محیط کشت‌های فعال به پلیت‌های سه گانه گروه اول حاوی دیسک داروئی گروه دوم پلیت‌های حاوی دارونما (پلاسبو) و گروه سوم پلیت‌های نرمال فاقد دیسک منتقل شد و محیط‌ها مجدداً در همان شرایط قبلی جهت مشخص شدن رشد و تکثیر انگل نگهداری شدند. سطح هر پلیت پس از نگهداری در دوره‌های زمانی مشخص، با استفاده از روش نمونه‌گیری مرطوب و مشاهده میکروسکوپی مستقیم مورد بررسی قرار گرفت و وضعیت انگل از نظر رشد و تکثیر و یا مرده و دژنره بودن و نیز شمارش انگل‌های مرده و زنده بررسی شد و با آماره کای دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

#### یافته‌ها

در پلیت‌های حاوی دیسک داروئی تا شعاع ۳ سانتی‌متری پروماستیگوت‌های انگل به صورت مرده و دژنره شده مشاهده شدند و هیچ نشانی حاکی از رشد و تکثیر انگل وجود نداشت. در لام‌های مستقیم تهیه شده از سطح محیط کشت پلیت‌های حاوی دیسک دارونما و بدون دیسک، انگل مطابق مشاهدات قبلی در حال تکثیر بود. به طوری که امکان مشاهده کولونی‌های تکثیر یافته

گرفت. این تحقیق هم‌چنین نشان داد که مجموعه ترکیبات تشکیل‌دهنده پایه دارو دارای پتانسیل مناسبی از نظر آزادسازی بسیار تدریجی دارو هستند و دوام این آزادسازی تا حدی است که قادر است رشد پروماستیگوت‌های انگل *Leishmania* را در روزهای پی در پی کنترل نماید. فیلم‌های تهیه شده در این مطالعه، شکل جدیدی از دارو است که آزاد شدن تدریجی آن باعث تماس مداوم انگل با دارو می‌گردد و در نتیجه تأثیر بیشتری در از بین بردن انگل دارد. بدین ترتیب می‌توان با توجه به نتایجی که از ادامه این تحقیقات بر روی مدل حیوانی صورت می‌گیرد این سیستم درمانی را بر روی انسان تطبیق داد و پیش‌بینی نمود که این روش درمانی می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های آسان درمانی با کم‌ترین عارضه معرفی گردد. لذا پیشنهاد می‌شود این بررسی با دوزهای مختلف برای تعیین مؤثرترین دوز کشندگی آن بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور صورت گیرد و مطالعاتی بر روی مدل‌های حیوانی طراحی شود.

#### تقدیر و تشکر

با تشکر از مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه طاهره که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند.

RPMI 1640 به میزان ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پارامومایسین مجاور شدند. محیط حاوی انگل و دارو در درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و تنها تعداد کمی از پروماستیگوت‌ها توانستند در محیط زنده باقی بمانند (۵). در مطالعه دیگری توسط همین محقق پروماستیگوت‌های انگل *Leishmania* جدا شده از بیماران در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پارامومایسین کشت داده شدند و مشاهده گردید ۸۵ تا ۹۹/۵ درصد پروماستیگوت‌ها ظرف ۴ روز تماس با دارو نابود شدند (۶).

لیشمانیوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انگل در مناطق گرمسیری است (۷). هنوز درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و از طرف دیگر درمان سیستمیک لیشمانیوز دارای عوارض و هزینه‌های خاص خود می‌باشد و باید این درمان برای موارد خاص در نظر گرفته شود. پارامومایسین آنتی‌بیوتیکی از گروه آمینوگلیکوزیدها است. ترکیبات مختلفی از آمینوزیدین موضعی بر روی پوست حیوانات و انسان برای درمان لیشمانیوز آزمایش شده است (۸) به منظور تأثیر بیشتر دارو، در این تحقیق شکل فیزیکی جدیدی از دارو تهیه شد و جهت بررسی چگونگی آزادسازی ماده مؤثر از فیلم پایه آن، مطالعه بر روی پروماستیگوت‌های محیط کشت انجام

#### References:

- 1- WHO. Technical Report Series. *Control of the Leishmaniasis*. Report of a WHO expert Committee. 1990; 793: 1-158.
- 2- WHO. *Leishmaniasis*. Tropical disease research progress, 1995-96; 13<sup>th</sup> program report. p: 101-5.
- 3- Koerber WA. Treatment of cutaneous leishmaniasis with antiomny sodium stibogluconate. *Arch Dermatol* 1978; 114: 1226.
- 4- Maarouf M, Lowrence F. Biochemical alteration in Paromomycin treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol. Res* 1997; 83: 198-202.
- 5- EL-on J. *Leishmania major*: resistance of promastigotes to paromomycin and susceptibility of amastigotes to paromomycin – Methylbenzethonium chloride ointment. *Ann Trop Med Parasitol* 1991; 85: (3) 323-28.
- 6- EL-on J, Cawich F, Evans DA, Weinrauch L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis in Belize in vitro and in vivo studies with *Leishmania mexicana*. *J Parasitol* 1993; 23(1): 121-7.
- 7- Modabber F. *Tropical disease research*. 12<sup>th</sup> program report. UNDP/World Bank/ W.H.O. Special program for research and training in tropical disease. (TDR) Geneva: WHO. 1995; p: 134-146.
- 8- Neal RA, Murphy AG, Olliaro P. Aminosidine ointment for the treatment. Of experimental leishmaniasis. *Trans Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 223-25.