بررسی تأثیر دیسک های دارویی پاراومومایسین و جنتامایسین سولفات بر رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا

دکتر سید حسین حجازی[۱]، سپیده طلوعی[۲]، دکتر علی اصیلیان[۲]، دکتر محمد شاطالبی[۳]، مهیار مستقیم[۲]
دکتر گیتی صادقیان[٤]

چکیده

سابقه و هدف: نظر به شیوع و هیپرآندمیک بودن بیماری لیشمانیوز در بعضی مناطق کشور و مشکلات درمانی سالک و وجود بعضی گزارشات از موفقیت پاراومومایسین در درمان بیماری و به منظور تعیین تأثیر کشندگی شکل فیزیکی جدیدی از این دارو بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور، این تحقیق در شرایط برون‌تنی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش EXPRIMENTAL انجام گرفت. فیلم‌های دارویی حاوی ۱۵ درصد پاراومومایسین سولفات و ۰/۵ درصد جنتامایسین سولفات در پایه‌ای از اتیل سلولز و HPMC (هیدروکسی ـ پروپیل ـ متیل ـ سلولز) با هدف ابداع یک راه درمانی برای لیشمانیوز جلدی تهیه گردید. به منظور بررسی چگونگی آزاد شدن دارو و تأثیر آن بر انگل‌های 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. محیط‌های مورد بررسی شامل، محیط‌های حاوی دیسک دارویی، محیط‌های بدون دیسک دارویی و محیط‌های دارای دیسک پلاسبو بود و میزان کشندگی آن با آماره کای دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: در پلیت‌های فیلم‌های دارویی هاله‌ای از عدم رشد کولونی‌های انگل مشاهده گردید. به صورتی که در شعاع ۳ سانتی‌متری اطراف فیلم دارویی هیچ ناحیه رشد انگل وجود نداشت و یا پروماستیگوت‌های انگل به صورت مرده و دژنره شده مشاهده گردید. حال آنکه در تمام سطوح محیط کشت‌های حاوی پلاسبو و محیط فاقد فیلم کولونی‌های در حال تکثیر انگل مشاهده گردید. درصد انگل‌های مرده به زنده در پلیت‌های پلاسبو و فاقد دارو ۹۸ درصد و در گروه دارویی ۵ درصد بود ($P<۰/۰۰۰$).

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: دیسک‌های دارویی پاراومومایسین و جنتامایسین سولفات، پتانسیل مناسبی برای رهاسازی تدریجی دارند و موثر بر رشد انگل هستند، لذا می‌توان انتظار داشت که این آزاد شدن تدریجی بر روی زخم‌های انسانی نیز برقرار باشد و انجام آن را توصیه می‌نماید.

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
٤- متخصص پوست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-09-13]

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).

پاراومومایسین 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 (٤) در این زمینه مطالعات مختلفی تأثیر پاراومومایسین را بر روی پروماستیگوت انگل Leishmania در شرایط برون تنی مشخص نموده است (۵ و ٦) 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 پاراومومایسین 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 EXPRIMENTAL انجام گرفت. از سویه استاندارد Leishmania major با 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 انجماد فاز لگاریتمی انگل می‌باشد لذا غلظتی از انگل به میزان ۱×۱۰^{٦} 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 ٤ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و پس از آن به مدت ۲٤ ساعت در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از آن به فریزر ۹٦- 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-09-13]

(N.N.N) Navy Neal 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 پارافیلم بسته شد و در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۱۰ تا ۱٤ 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 دارویی 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 دارویی 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 مشاهدهٔ کولونی‌های تکثیر یافته 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 ($P<۰/۰۰۰۱$). 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 انگل های لیشمانیا بر حسب حیات و به تفکیک نوع پلیت

وضعیت حیات انگل / نوع پلیت	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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-09-13]

RPMI 1640 به میزان ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پاراومومایسین 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 پاراومومایسین کشت داده شدند و مشاهده گردید ۸۵ تا ۹۹/۵ درصد پرماستیگوت‌ها ظرف ٤ روز تماس با دارو نابود شدند (٦).

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. پاراومومایسین 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 پایهٔ آن، مطالعه بر روی پروماستیگوت‌های محیط کشت انجام گرفت. این تحقیق هم‌چنین نشان داد که مجموعه ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ 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.

References:

1- WHO. Technical Report Series. ***Control of the Leshmaniasis***. Report of a WHO expert Committee. 1990; 793: 1-158.

2- WHO. ***Leishmaniasis***. Tropical disease research progress, 1995-96; 13th 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***. 12th 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-09-13]