● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ دهم، شماره۳، ص ۱۶۵-۱۵۸، ۱۳۸۲

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر الوپورینول بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (ASKH5) مقاوم به گلوکانتیم در محیط آزمایشگاهی

دکتر منظومه شمسی میمندی[۱]، دکتر شهریار دبیری[۲]، میترا بحرینی[۳]

خلاصه

لیشمانیوز در ۹۷ کشور جهان اندمیک می‌باشد و درمان آن به عنوان هفتمین الویت تحقیقاتی از طرف WHO مطرح شده است. افزایش روز افزون انواع مقاوم به گلوکانتیم که درمان انتخابی این بیماری است، ضرورت بررسی اثر داروهای دیگر مانند الوپورینول را بر این انواع ایجاب می‌کند. لذا در این مطالعه پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (L. Major ASKH5) در مجاورت غلظت های افزاینده گلوکانتیم کشت داده شد تا انواع مقاوم به ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر گلوکانتیم حاصل شد. سپس تغییرات سیتولوژیک و تأثیر غلظت های مختلف الوپورینول (از ۰/۰۰۲۵ تا ۰/۵میلی گرم بر میلی لیتر) بر درصد رشد نوع مقاوم و اولیه در محیط آزمایشگاهی بررسی و مقایسه شد. بررسی سیتولوژیک نشان داد که طی پروسه مقاوم شدن ابعاد پروماستیگوت ها و طول فلاژل کاهش یافته در حالیکه تعداد فرم Pseudoamastigots افزایش یافته است. سرعت رشد نوع اولیه پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بیش از نوع مقاوم بود. درصد رشد نوع اولیه تحت تأثیر الوپورینول بطور معنی داری کاهش یافت، اما این دارو تأثیر معنی داری بر رشد نوع مقاوم نداشت. درصد رشد نوع مقاوم فقط در غلظت های ۰/۰۱ و ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر الوپورینول کاهش یافت در حالی که در غلظت های بالاتر و پایین‌تر تأثیر معنی داری نداشت. بر اساس نتایج این مطالعه الوپورینول به عنوان داروی خوراکی و مقرون به صرفه در درمان نوع اولیه لیشمانیوز ماژور توصیه می گردد اما استفاده از این دارو به تنهایی در انواع مقاوم توصیه نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت، مقاومت دارویی، الوپورینول، گلوکانتیم

۱- مربی فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب ، ۲- دانشیار پاتولوژی، ۳- کارشناس ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان

مقدمه

لیشمانیوز در ۹۷ کشور جهان اندمیک است و درمان آن به عنوان هفتمین الویت تحقیقاتی از طرف WHO مطرح شده است(۲۰). عامل بیماری زای آن تک یاخته‌ای از دسته کینتوپلاست‌داران است (۱). فرم پروماستیگوت آن در رودهٔ پشهٔ خاکی (فلبوتوم) زندگی کرده و تکثیر می‌یابد و با نیش پشه از طریق بزاق حیوان به بدن میزبان انتقال می‌یابد (۱). انگل در صورتَ ورود به ماکروفاژها و هیستوسیت های تکثیر یافته و موجب لیشمانیوز می‌گردد (۲). عامل بیماری زای سالک خشک نوع تروپیکا بوده و پاپول خشک آن بیشتر در صورت دیده می‌شود. عامل بیماری زای سالک مرطوب روستایی لیشمانیا ماژور بوده و تظاهرات بالینی آبسه مانند آن، بیشتر در دست و پا مشاهده می‌شود(۲). گلوکانتیم و پنتوستام، ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان، درمان انتخابی لیشمانیوز پوستی می‌باشند (۱۳). با این وجود هر ساله در جهان ۴۰۰۰۰۰ مورد جدید گزارش می‌شود و عدم پاسخ‌دهی به گلوکانتیم رو به افزایش است (۱۱،۱۳).

ماهیت مقاومت دارویی انگل دقیقاً شناخته نشده است. روش آزمایشگاهی (Semiautomated microdilution technique) SAMT که با نتایج بالینی به میزان ۸۷/۵٪ تطبیق می‌کند نشان داده است که در طبیعت سویه‌های مقاوم وجود دارند(۱۱) اما انواع مقاوم گاه به علت درمان های مکرر با دوز ناکافی نیز بروز می‌کنند (۹). در صورت عدم بهبودی بیماری با داروی انتخابی (ترکیبات آنتی موان) از روش های درمانی مانند کرایوتراپی و ترموتراپی استفاده شده و یا داروهای دیگری مانند الوپورینول، پنتامیدین و آنفوترسین تجویز می‌شوند(۵). در این میان الوپورینول خوراکی ارزان و مقرون به صرفه بوده و به علت راه تجویز مناسب استفاده از آن توصیه می‌شود (۱۶). ترکیبات آنتی موان با وقفه گلیکولیز و اکسیداسیون اسیدهای چرب موجب مرگ انگل می‌شوند (۶)، در حالیکه آلوپورینول با انحراف سنتز نوکلئوتیدهای حیاتی موجب انهدام آن می‌شود (۱۴،۲۱). مکانیسم اثر این دو دارو متفاوت بوده و از مسیرهای مختلف، سیستم های حیاتی انگل را مختل می‌کند. در صورت بروز مقاومت به ترکیبات آنتی موان و رشد سویه‌های مقاوم، استفاده از الوپورینول که مکانیسم اثر متفاوت دارد منطقی به نظر می‌رسد. در یک بررسی کلینیکی لیشمانیوز پوستی، بهبود بیمارانی که مجموعه دارویی الوپورینول به علاوه گلوکانتیم دریافت کرده بودند بیش از بیمارانی بود که فقط گلوکانتیم دریافت کرده بودند. به علاوه الوپورینول درصد بهبودی مشابه گلوکانتیم نشان داده است (۱۶). لذا با توجه به اینکه بررسی تأثیر آلوپورینول بر انواع مقاوم امری ضروری به نظر می‌رسد، در این مطالعه ابتدا انواع مقاوم به گلوکانتیم را در محیط آزمایشگاهی *(in vitro)* ایجاد نمودیم، سپس تغییرات سیتولوژیک و تأثیر غلظت های مختلف آلوپورینول را نیز بررسی کردیم.

مواد و روش کار

پروماستیگوت های Leishmania با کد ASKH5 از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردید. این سویه در محیط کشت مایع (Gibco,Co,Uk) رشد و تکثیر انبوه گردید.

داروهای مورد استفاده پودر خالص الوپورینول، تهیه شده از شرکت تولید دارو ایران و گلوکانتیم به صورت آمپول ۱/۵mg/5ml شرکت اسپسیا فرانسه بود.

مقاوم کردن سویه اولیه 5AKSH به طریق آزمایشگاهی

سویه اولیه پروماستیگوت ها در محیط مایع RPMI 1640 کشت داده شد. این سویه WM (wild type major) نامگذاری شد. کشت پس از دو روز انکوباسیون در دمای ۲۳°c به حداکثر فعالیت خود رسید. در مشاهده با میکروسکوپ نوری (با بزرگنمایی ×۱۰)، دسته های تقسیم یا Rossette مشاهده شد. 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 پروماستیگوت ها توسط لام نئوبار شمارش و غلظت آن $۱/۶\times۱۰^{۶}$ در میلی لیتر بود. این کشت با ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید(سانتریفوژ Clemente 2000). این عمل به منظور بالا بردن غلظت کشت بدون از دست دادن انگل انجام شد. مشاهده توسط میکروسکوپ نوری حاکی از این بود که در قسمت بالا تعداد کمی انگل و بخش عمده انگل ها در قسمت پایین لوله قرار داشتند. با تهیه لام از هر دو قسمت و رنگ آمیزی گیمسا و مقایسه آنها اطمینان حاصل گردید

که سانتریفوژ موجب تخریب و تغییر ساختمانی انگل نشده است. لازم به ذکر است که این سرعت سانتریفوژ و مدت آن پس از آزمایشات مکرر به طور تجربی حاصل شده است و در تحقیقات قبلی سابقه ندارد.

جهت مقاوم کردن، سویه اولیه به تدریج در مجاورت غلظت های افزاینده گلوکانتیم قرار گرفت. از این رو قسمت فوقانی تخلیه و به قسمت تحتانی محیط کشت جدید حاوی محلول دارویی گلوکانتیم اضافه شد به طوری که غلظت گلوکانتیم در محیط ۱mg/ml باشد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای۲۳°c، کشت که M1 نامگذاری شد، فعال بوده، دسته های تقسیم تشکیل داده و رنگ آن زرد روشن بود. مانند قبل M1 را سانتریفوژ کرده و ۵ لام در رنگ آمیزی گیمسا تهیه شد. به همین ترتیب کشت M2 در مجاورت ۵mg/ml، M3 در مجاورت ۱۰mg/ml، M4 در مجاورت ۱۴ mg/ml، M5 در مجاورت ۳۰mg/ml، M6 در مجاورت ۵۰mg/ml ، M7 در مجاورت ۸۴mg/ml؛ M8 در مجاورت ۱۱۲/۵mg/ml، M9 در مجاورت ۱۵۰mg/ml و M10 در مجاورت ۲۵۰mg/ml گلوکانتیم رشد کردند.

لازم به ذکر است که مانند M1 از هر پاساژ ۵ لام در رنگ آمیزی گیمسا، جهت بررسی سیتولوژیک تهیه شد. بدین ترتیب سویه مقاوم به ۲۵۰mg/ml گلوکانتیم که آن را RM (resistant Type Major) می نامیم، حاصل شد.

کشت سویه مقاوم (RM) و سویه اولیه (WM) در مجاورت آلوپورینول

با توجه به غلظت های پایین آلوپورینول که در این طرح مورد نیاز است (۱۳)، از محلول فیزیولوژیک که آسیبی به محیط کشت نمی رساند به عنوان حلال استفاده شد. از RM کشت مادری در مرحله فعال رشد تهیه شد. غلظت آن $۱۰^{۶}$×(۰/۰۴ ±۰/۶۶) در هر میلی لیتر بود. سپس در هشت لوله آزمایش مجزا محیط کشت و محلول دارویی طوری اضافه شد که غلظت آلوپورینول به ترتیب ۰ و ۰/۰۰۲۵ و ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ و ۰/۰۲. ۰/۰۵ و ۰/۱۲۵ و ۰/۵ در هر میلی لیتر باشد. هر هشت لوله به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۳°c انکوبه شدند. سپس از هر لوله حداقل ۶ شمارش توسط لام نئوبار انجام شد. از سویه اولیه (WM) کشت مادری تهیه شد که غلظت آن $۱۰^{۶}$×(۰/۱۶±۰/۹۸) در هر میلی لیتر بود. سپس مانند سویه مقاوم هشت کشت در مجاورت غلظت های مذکور انجام شد. درصد رشد بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

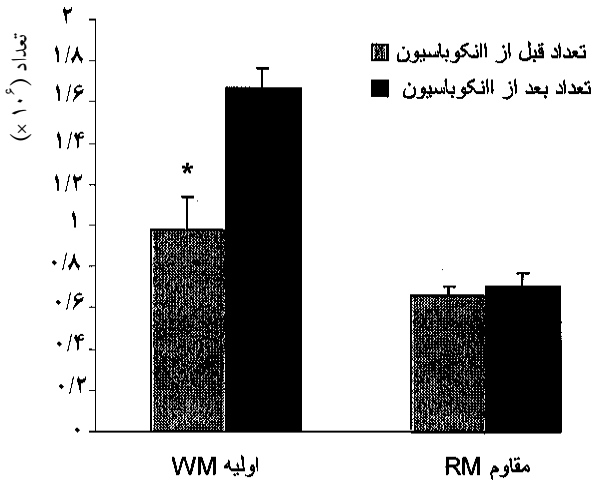
$$\text{درصد رشد در هر غلظت آلوپورینول} = \frac{\text{تعداد انگل در غلظت صفر} - \text{تعداد انگل در آن غلظت}}{\text{تعداد انگل در غلظت صفر}} \times ۱۰۰$$

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS و آزمون های Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U استفاده شد. با توجه به تعدد مقایسات سطح معنی داری (P<۰/۰۰۲) با استفاده از روش تطبیق بونفرونی اختیار گردید. در آزمونt-test P<۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

نتایج

تأثیر آلوپورینول بر WM و RM مقایسه آن

WM با غلظت اولیه $۱۰^{۶}$×(۰/۱۶±۰/۹۸) انکوبه شد. پس از ۴۸ ساعت تعداد آن به ml $۱۰^{۶}$ ×(۰/۰۹±۱/۶۷) رسید در طول این مدت تعداد انگل ها (۱۵±۵۵) درصد اافزایش یافت (نمودار ۱).



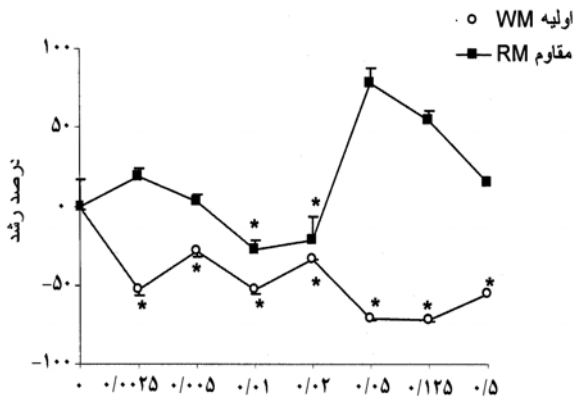
نمودار ۱: تعداد پروماستیگوت های اولیه *(WM)* و مقاوم *(RM)* لیشمانیا ماژور قبل و بعد از انکوباسیون

پروماستیگوت های اولیه و مقاوم لیشمانیا ماژور با غلظت حدود $۱۰^{۶}$ طبق روش کار در محیط در RPMI-1640 و در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون تعداد پروماستیگوت های اولیه بطور معنی داری افزایش یافت در حالی که تعداد سویه مقاوم تغییر معنی داری نکرد. (از هر کشت حداقل ۶ شمارش مجزا با لام نئوبار انجام شد). داده ها بر اساس Mean±SEM می باشد.

* اختلاف معنی دار با تعداد قبل از انکوباسیون P<۰/۰۵

نمودار ۲ نشان می دهد که آلوپورینول در تمام غلظت های مورد آزمایش موجب کاهش معنی دار درصد رشد WM شد. به طوری که فقط ۰/۰۰۲۵mg/ml آلوپورینول بطور معنی داری موجب کاهش تعداد انگل شد.

غلظت های mg/ml ۰/۰۵ و ۰/۱۲۵ آلوپورینول بیشترین کاهش درصد رشد را ایجاد کردند. در این غلظت ها درصد رشد تا ۷۳٪ کاهش یافت. با این وجود آنالیز واریانس تفاوت معنی داری بین غلظت های مختلف نشان نداد (نمودار ۲).



نمودار ۲: تأثیر الوپورینول بر درصد رشد پروماستیگوت های اولیه و مقاوم لیشمانیا ماژور

درصد رشد پروماستیگوت های اولیه (WM) در تمام غلظت های مورد آزمون الوپورینول بطور معنی داری نسبت به غلظت کاهش یافت. در حالی که بین غلظت های مختلف، اختلاف معنی داری مشاهده نشد. درصد رشد پروماستیگوت های مقاوم (RM) فقط در غلظت های ۰/۰۱ و ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر آلوپورینول بطور معنی داری کاهش یافت. در حالیکه بین غلظت های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد. درصد رشد WM در تمام غلظت های آلوپورینول (غیر از ۰/۰۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر) بطور معنی داری کمتر از RM بود. داده ها بر اساس Mean±SEM می باشد. * کاهش معنی دار نسبت به غلظت صفر (P<۰/۰۰۲)

مقایسه بین RT و WT نشان می دهد سرعت رشد RT بطور معنی داری کمتر از سویه اولیه بود. همانطور که قبلاً ذکر شد ۴۸ ساعت انکوباسیون در محیط کشت موجب افزایش ۱۵±۵۵ درصد تعداد پروماستیگوت ها در سویه اولیه شد در حالی که در این مدت تعداد سویه مقاوم فقط ۲±۷ درصد افزایش یافت (نمودار ۱). مقایسه درصد رشد بین کشت RM و WM تقریباً در تمام غلظت های مورد آزمون نشان داد که درصد رشد WM همواره بطور معنی داری کمتر از RM بود. (فقط در غلظت ۰/۰۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر آلوپورینول این اختلاف معنی دار نبود) (نمودار۲).

بررسی سیتولوژیک

لام های تهیه شده از WM: سطح سیتوپلاسم صاف، هسته در مرکز، کینتوپلاست در قطب و طول فلاژل طبیعی بود.

لام های تهیه شده از M_1 : هسته به کینتوپلاست نزدیک شده بود. قطر انگل $\frac{2}{3}$ قبل بود، ادم داخل سلولی همراه با واکوئل و گرانول های اتوفاژی پراکنده در سر انگل دیده شد، انتهای خروجی فلاژل پهن شده بود.

لام های تهیه شده از M_2: نزدیکی هسته به کینتوپلاست واضح تر بود. قطر انگل $\frac{1}{2}$ الی $\frac{1}{3}$ طبیعی به نظر می رسید. ادم داخل سلولی و مواد گرانولوسیتی در سطح سیتوپلاسم به طور نامنظم مشاهده می شد.

لام های تهیه شده از M_3 و M_4 : مانند M_2 بودند.

لام های تهیه شده از M_5: قطر انگل همچنان $\frac{1}{3}$ تا $\frac{1}{2}$ اندازه طبیعی بود. نمونه های کوچکتر (Pseudoamastigot) به طور پراکنده دیده می شدند. ادم داخل سلولی واضح و واکوئل های گرانولی اتوفاژی نیز دیده می شدند.

لام های تهیه شده از M_6-M_7-M_8 : قطر انگل همچنان رو به تنزل می رفت. فرم Pseudoamastigot بیشتر دیده می شد و سیتوپلاسم نامنظم تر و ادم سلولی بیشتر دیده شده بود.

لام های تهیه شده از M_9 : قطر انگل $\frac{1}{2}$ مقدار طبیعی شده بود. هسته کاملاً نزدیک کینتوپلاست قرار گرفته، دم کوتاه و متراکم شده، تعداد زیادی واکوئل داخل سلول دیده می شد.

لام های تهیه شده از RM: قطر کمتر از نصف مقدار طبیعی شده بود. هسته نزدیک کینتوپلاست قرار داشت. فلاژل کوتاه و در کناره ها دیده می شد. سطح ستوپلاسم نامنظم بوده، ادم همراه با واکوئل اتوفاژی مشاهده می شد.

بحث و نتیجه گیری

داروی انتخابی در درمان اشکال مختلف لیشمانیوز پوستی ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان (پنتوستام و گلوکانتیم) می باشند (۱۳). با این وجود عدم پاسخگویی به این ترکیبات رو به افزایش است(۷،۱۱).

بعضی از سویه های انگل لیشمانیا بطور ذاتی نسبت به درمان مقاوم هستند (۱۱،۱۹). هنوز مکانیسم های مقاومت دارویی به خوبی شناخته نشده است. برخی از محققین این مقاومت دارویی را به تفاوت های فارماکوکینتیک دارو یا تفاوت های سیستم ایمنی بیمار نسبت داده، در حالیکه برخی دیگر استفاده از دوزهای ناکافی و یا مکرر دارو را مسئول عدم بهبودی و بروز مقاومت آزمایشگاهی قلمداد می کنند (۹،۱۰). در هر صورت مقاومت دارویی در درمان لیشمانیوز پوستی مشکلات عدیده ای ایجاد کرده است. از اینرو افزودن داروهای دیگر به درمان انتخابی توصیه می شود (۷).

الوپورینول یکی از داروهای مؤثر در درمان لیشمانیوز محسوب می شود. این دارو در محیط آزمایشگاهی بر سویه های مختلف انگل مؤثر می باشد (۱۴). در منطقه هایپراندمیکی مانند اصفهان مؤمنی و همکاران نشان دادند که تجویز الوپورینول به همراه گلوکانتیم (حتی در دوز پایین) تأثیری بیش از گلوکانتیم به تنهایی در درمان لیشمانیوز ماژور داشته است (۱۸). مشابه این مطالعه در کلمبیا نیز همین نتایج را در بر داشته است (۱۵). الوپورینول به تنهایی در درمان لیشمانیوز پوستی مکزیکی و نوع حیوانی (infantum) نیز نتایج مطلوبی داده است (۳،۸) مطالعه بالینی دیگر تجویز گلوکانتیم به تنهایی موجب بهبود ۳۶ درصد بیماران شد در حالیکه افزودن الوپورینول به رژیم درمانی درصد بهبودی را ۷۴ درصد افزایش داد. در همین مطالعه تجویز الوپورینول به تنهایی موجب بهبودی ۸۰ درصد بیماران شد. از این رو Marr و Martinez تجویز الوپورینول را به تنهایی همراه گلوکانتیم در درمان لیشمانیوز پوستی آمریکایی توصیه کرده اند (۱۶). در انواع مقاوم به گلوکانتیم نیز الوپورینول خوراکی توصیه شده است. مانند لیشمانیوز Reicidivant که به درمان گلوکانتیم به تنهایی پاسخ نمی دهد. در بیمارانی که بیش از دو سال سابقه ابتلا داشتند افزودن الوپورینول به رژیم درمانی موجب بهبودی ۹۶٪ بیماران شد (۱۷).

در این مطالعه نیز الوپورینول موجب کاهش معنی دار درصد رشد پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (سویه ASKH5) شد. اندازه گیری غلظت سرمی در بیماران که تحت درمان الوپورینول خوراکی قرار گرفته اند نشان داد که تجویز ۳۰۰ میلی گرم در روز یا 5mg/kg، غلظت سرمی ۲-۱ میکروگرم بر میلی لیتر ایجاد کند. در حالیکه تجویز دوز بالا یا 15mg/kg حداکثر غلظت سرمی برابر ۴/۵ میکروگرم بر میلی لیتر ایجاد کند (۴).

در این مطالعه نیز حداقل غلظت بکار رفته (یا ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) موجب کاهش بیش از ۵۰٪ رشد پروماستیگوت های اولیه شد. بدین ترتیب نتایج این مطالعه، تحقیقات بالینی در مورد نوع غیر مقاوم را تأیید می کند. به علاوه بررسی غلظت های مختلف الوپورینول نشان داد که افزایش حتی بیست برابر غلظت الوپورینول موجب تغییر معنی دار در کاهش درصد رشد نوع اولیه (WM) نمی شود. لذا استفاده از دوز بالای الوپورینول تأثیر معنی داری ایجاد نکرده و جایز نیست.

پروماستیگوت های مقاوم آزمایشگاهی RM الوپورینول فقط در غلظت های ۰/۰۱ و ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر موجب کاهش معنی دار درصد رشد شد. همان طوری که قبلاً ذکر شد حداکثر غلظت سرمی که الوپورینول در بیماران ایجاد می کند ۴/۵ میکروگرم بر میلی لیتر است (۴). بنابر نتایج این مطالعه جهت کاهش درصد رشد پروماستیگوت های مقاوم باید غلظت سرمی به ۱۰ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر برسد. ایجاد چنین غلظت سرمی مستلزم تجویز مقادیر بالا و احتمالاً سمی الوپورینول می باشد. به علاوه رابطه دوز اثر در (RM) مشاهده نشد زیرا غلظت های بالای الوپورینول حتی موجب افزایش درصد رشد (RM) نیز شده است. بنابراین استفاده از الوپورینول در انواع مقاوم جایز نیست. این نتیجه با نتایج سایر تحقیقات بالینی که بر روی انواع مقاوم لیشمانیوز ماژور انجام شده است هماهنگی دارد زیرا در بررسی متون مشاهده می شود که افزودن الوپورینول خوراکی درصد بهبودی را افزایش داده است اما گزارشی مبنی بر تأثیر الوپورینول به تنهایی در انواع مقاوم لیشمانیوز ماژور مشاهده نشده است. البته بایستی این نکته را در نظر داشت که بیماری زایی انگل به علت تکثیر فرم اماستیگوت در ماکروفاژ می باشد و در بسیاری موارد اثر داروها بر فرم پروماستیگوت با اثر آن بر اماستیگوت تفاوت دارد(۱۲).

در این تحقیق طی پروسه مقاوم شدن، تغییرات ساختمانی مشاهده شد. به طوری که مجاورت با

غلظت های افزاینده گلوکانتیم به تدریج موجب کاهش ابعاد طول فلاژل و افزایش فرم Pseudoamastigot شده است. با توجه به مکانیزم اثر گلوکانتیم (۱۳) احتمال می رود که اکسیداسیون اسیدهای چرب و گلیکولیز در انواع مقاوم تغییر یافته باشد (۴) و موجب کاهش حرکت پروماستیگوت ها و کاهش سرعت رشد و تکثیر آنها شده باشد. الوپورینول موجب انحراف سنتز نوکلئوتیدهای حیاتی در مرحله تکثیر می شود و از این طریق موجب مرگ سلول می گردد (۴،۹). از اینروست که الوپورینول در RM که سرعت رشد و تکثیر پایینی دارد، مؤثر واقع نشد.

تزریق گلوکانتیم جهت درمان لیشمانیوز پوستی در بسیاری از مناطق اندمیک مقدور نمی باشد ولی الوپورینول خوراکی درمان مؤثر آسان و ارزانی محسوب می شود (۱۵،۱۶). از این رو نتایج این تحقیق و مطالعات قبلی استفاده از الوپورینول را در نوع اولیه (یا غیرمقاوم) حتی در دوزاژ پایین تأیید می کند. اما تجویز آن به تنهایی در انواع مقاوم به درمان انتخابی، توصیه نمی شود.

سپاسگزاری

مجری طرح از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که هزینه های مربوطه را تقبل نموده اند و خانم آذری که در تایپ و صفحه بندی همکاری داشته است، سپاسگزاری می کند.

Summary

Effect of Allopurinol on L. Major Promastigots Resistant to Glucantim *In vitro*

Shamsi–Meymandi M., Pharm.D.[1] , Dabiri Sh, M.D. [2] and Bahreini M, BSc.[3]

1. Instructor of Pharmacology, Neuroscience Research Center, 2. Associate Professor of Pathology, 3. Batchlor in Genetics, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman Iran

Treatment of Leishmaniasis which is endemic in 97 conutries around the world is important and is ranked 7th among research priority of WHO. As the number of resistant types to glucantim (drug of choice) is increasing, investigation on the effect of other drugs like allopurinol seems essential. In this survey, we cultured L-Major ASKH5 promatigotes in different media containing glucantim with concentrations up to 250 mg/ml. Then we observed the cytological changes of L-Major ASKH5 promastigote and investigated and compared the effect of different concentrations of alloporinol (from 0.0025 to 0.5 mg/ml) by measuring the growth rate percentage of wild and resistant types. Our cytological survey showed that the size of promastigote and the length of its flagell decreases while the number of pseudoamastigot forms increases in the resistiing process. After 48 hours of incubation, the growth rate of wild type was more than resistant type. Also, the growth rate of the wild type under the influence of allopourinol was decreased significantly. However, increasing allopurinol concentration did not have significant effect on the growth rate of wild type. The growth percentage of resisant type was reduced at concentrations of 0.01 and 0.02 mg/ml of allopurinol, while it had no significant effect at higher or lower concentrations. As a result of this survey, it is recommended that allopourinol to be prescribed as an oral and cheap medicine for the L-Major wild type, but it is should not be prescribed alone in the resistant type.

Key Words: *Leishmania Major, Promastigote, Drug resistance, Allopurinol, Glucantim*
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2003; 10(3): 158-165:

منابع

۱. اردهالی، صدرالدین، رضایی، ندیم، ابوالحسن: انگل لیشمانیا و لیشمانیوز. مرکز نشر دانشگاهی ۱۳۶۴، ص ۶-۱.

۲. ندیم، ابوالحسن، حدادیان، عزت الدین و سید دستی، محمدعلی. همه گیری شناسی لیشمانیوز در ایران، انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها. مرکز نشر دانشگاهی ۱۳۶۴، ص ۱۵۰-۱۷.

3. Baum KF and Berens RL. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol after failure of treatment with ketoconazole. *Clin Infect Dis* 1994; 18(5): 813-815.
4. Berman JD. Chemotherapy of leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev Infect Dis* 1988; 10(3): 560-86.
5. Berman JD. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996; 14(5): 519-529.
6. Berman JD, Edwards N, King M and Grogl M. Biochemistry of pentostam resistant leishmania, *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40(2): 159-164.
7. Bryceston A. A policy for leishmaniasis with respect to prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health* 2001; 6(11): 928-934.
8. Ghanem BM, el-Shazly AM, Fawzy M, Arafa MA. and Morsy TA. Allopurinol in the treatment of zoonotic cutaneous Leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol* 1996; 26(3): 619-628.
9. Gramiccia M, Gradoni L and 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; 86(6): 613-620.
10. Grogl M, Oduola AM, Cordero LD and Kyle DE. Leishmania spp: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol* 1989; 69(1): 78-90.
11. Grogl M, Thomason TN and Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemiotherapy of mucocutaneous disease. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 560-580.
12. Ibrahim ME, Hag- Ali M, el-Hassan AM, Theander TG and Kharazmi A. Leishmania resistant to sodium stibogluconate: drug-associated macrophage-dependente killing. *Parasitol Res* 1994; 80(7): 569-74.
13. Koff AB and Rosen T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Derm* 1994; 31(5): 693-708.
14. Marr JJ and Benens RL. Antileishmanial effect of Allopurinol. *J Infect Disease* 1997; 136(6): 724-731.
15. Martinez S, Gonzalez M and Vernaza ME. Treatment of cutaneous leishmaniasis with Allopurinol and stibogluconate. *Clin Infect Dis* 1997; 24(2): 165-169.
16. Martinez S and Marr JJ. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 1992; 326(11): 741-744.
17. Momeni AZ and Aminjavaheri M. Treatment of recurrent cutaneous Leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1995; 34(2): 129-33.
18. Momeni AZ, Ressizadae MR and Aminijavaheri M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with combination of

allopurinol and low-dose meglumine antimoniate. *Int J Dermatol* 2002; 41(7): 441-443.

19. Moriera ESA and Petrillo P. *In vitro* activity of meglumine antimonite, a pentavalent antimonial drug on leishmania promastigotes. *Brazil J Med Biol Res* 1991; 24: 459-469.
20. Quellette A and Papadopoulou B. Mechanisms of drug resistance in Leishmania. Parasitology Today. 1993; 9(5): 150-163.
21. Saenz RE, Paz HM, Johnson CM *et al.* Treatment of American cutaneous leishmaniasis with orally administered Allopurinol riboside, *J Infect Dis* 1989; 160(1): 153-158