Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

مروری بر میزان شیوع و علل مقاومت دارویی در بیماری سالک به ترکیبات آنتیموان در جوامع مختلف: *مقاله مروری*

فریبا جعفری[۱و۲]
لطیفه عبداللهی[۱*]
محمد علی نیلفروش‌زاده[۲]

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، مجتمع تحقیقاتی الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: اصفهان، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، مجتمع تحقیقاتی الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.
تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۲۳۹۲۹
E-mail: latifeabdellahi@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۹ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۳۱

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های انگلی اندمیک می‌باشد. در حال حاضر برای درمان بیماری از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان از جمله پنتوستام و گلوکانتیم به‌عنوان خط اول درمان این بیماری استفاده می‌شود و مقاومت به این داروها به‌صورت یک مشکل بزرگ در آمریکا، اروپا، خاورمیانه و هند مطرح می‌باشد. نظر به دامنه وسیع مقاومت دارویی گزارش شده به ترکیبات انتیموان در ایران (۹/۴٪ تا ۹۴/۲٪) و عدم وجود مطالعه‌ای جامع در این زمینه، مطالعه حاضر به‌منظور جهت بررسی علل بروز مقاومت به این داروها طراحی گردید. از مهمترین علل مقاومت می‌توان به عوامل ژنی، پروتیینی، آنزیمی، عوامل داخل سلولی اشاره نمود. همچنین مکانیسم تبدیل دارو به فرم فعال و ورود آن به داخل سلول از طریق پمپ‌های سلولی و مکانیسم‌های مقاومت مرتبط با آن نیز مورد بحث قرار می‌گیرد. باتوجه به اهمیت موضوع، روش‌های مختلف تشخیص مقاومت دارویی از جمله کشت و روش‌های مولکولی نیز بررسی می‌شود. از آن‌جا که مکانیسم دقیق عملکرد گلوکانتیم مشخص نمی‌باشد به‌نظر می‌رسد عامل اصلی مقاومت به گلوکانتیم، عوامل ژنی و پروتیینی میانجی در ورود و خروج دارو باشد. در همین راستا پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آتی بر مبنای بررسی مقطعی میزان شیوع عوامل ژنی موثر بر مقاومت دارویی ترکیبات آنتیموان در نواحی اندمیک لیشمانیوز جلدی در ایران همراه با تعیین نوع گونه انگل توسط روش‌های مولکولی مانند Polymerase chain reaction (PCR) به انجام رسد. همچنین طراحی کارآزمایی‌های بالینی تصادفی شده جهت بررسی جایگزین‌های درمانی-دارویی مناسب در صورت بروز مقاومت دارویی به ترکیبات آنتیموان قابل توصیه است.

کلمات کلیدی: شیوع، لیشمانیوز جلدی، مقاومت دارویی.

بیماری لیشمانیوز یکی از مشکلات بهداشتی جهان به‌شمار می‌رود و جزو شش بیماری مهم مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر می‌باشد. ایران یکی از کانون‌های مهم لیشمانیوز جلدی بیماری سالک در جهان است و از نظر بالینی هر دو شکل روستایی زخم مرطوب و شهری زخم خشک وجود دارد که به‌ترتیب توسط لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا ایجاد می‌گردد.[۱و۲] در اغلب مناطق ایران نوع روستایی غالب است. آمار ثبت شده مبتلایان به سالک در کشور ما سالیانه حدود ۲۰ هزار نفر است و به‌نظر برخی متخصصان که ارقام واقعی پنج برابر این تعداد بوده و پس از مالاریا از مهمترین بیماری‌های انگلی در ایران به‌شمار می‌رود.[۱-۵] ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی (مانند گلوکانتیم و پنتوسام) خط اول درمان سالک می‌باشند. تزریق داخل عضلانی گلوکانتیم با دوز ۵۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (حداکثر به میزان ۱۰ ml در روز) مدت دو تا سه هفته می‌باشد. بیماران به مدت دو هفته پس از خاتمه درمان، هیچ دارویی مصرف نمی‌کنند و در صورت عدم بهبود یک دوره دیگر درمان فوق تکرار می‌گردد. بیماران هر هفته تا سه هفته پیاپی توسط پزشک ویزیت و

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

سه ماه پس از پایان درمان نیز پیگیری می‌شوند.[۶] همچنین تزریق داخل ضایعه گلوکانتیم هفته‌ای سه بار تا زمان بهبودی کامل زخم (کاهش ایندوراسیون و اپیتلیزاسیون کامل ضایعه) و یا حداکثر شش هفته انجام می‌گیرد.[۷] بر اساس پروتکل کشوری وزارت بهداشت و درمان، بیماران مقاوم به درمان با گلوکانتیم بیمارانی می‌باشند که دچار عود بیماری و یا شکست درمان بوده و حداقل دو دوره کامل ۲۱ روزه درمان به‌صورت سیستمیک یا حداکثر هشت هفته متوالی (هفته‌ای یک‌بار) به‌صورت موضعی دارو دریافت کرده و بهبودی حاصل نشده باشد.

ضایعات مقاوم به درمان به شکل ندول اریتماتوز و پلاک‌هایی با پوسته‌های کم و در موارد عود، ضایعه در محل پیشین همراه با پاپول جدید پدید می‌آید.[۸] با توجه گستره‌ی وسیع گزارش مقاومت دارویی به ترکیبات انتیموان در ایران (۹/۴٪ تا ۹۴/۲٪) و نبود مطالعه‌ای جامع در این زمینه، مطالعه مروری حاضر در جهت بررسی علل بروز مقاومت به این دارو و بررسی میزان شیوع عوامل موثر بر مقاومت دارویی طراحی گردید. جستجو از پایگاه‌های PubMed و Google Scholar با کلمات کلیدی لیشمانیوز جلدی، ترکیبات آنتیموان، گلوکانتیم، مقاومت دارویی، عوامل موثر بر مقاومت به گلوکانتیم در بازه زمانی بین ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۵ انجام گرفت. فراوانی مقاومت به گلوکانتیم به تفکیک سال و مکان جغرافیایی و نوع لیشمانیوز در جدول ۱ آمده است.

در جدول ۲ عوامل دخیل در بروز مقاومت به گلوکانتیم آورده شده است.

۱- عوامل ژنی: طی مطالعه‌ای که توسط Fakhri Jeddi و همکاران انجام شد، ژن‌های دخیل در مقاومت ایزوله‌های لیشمانیا به ترکیبات آنتیموان و عملکرد سلولی آن‌ها شامل موارد مختلفی است که در زیر به آن اشاره شده است (جدول ۳).[۹]

عوامل پروتیینی: در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ جهت تشخیص پروتیین‌های دخیل در مقاومت به گلوکانتیم در لیشمانیا ماژور به روش الکتروفورز دو بعدی (2-DE) انجام شد، از بین ۲۹۶۷ پروتیین به‌دست آمده، ۸۹ مورد که مسئول مقاومت دارویی لیشمانیا ماژور بودند، از لحاظ بیان ژنی تغییر کرده بود. از جمله علل دخیل در مقاومت به گلوکانتیم شامل افزایش بیان یوبی‌کوییتین و ژن‌های AAP3، افزایش فعالیت MRPA و PTP و PGK و مهار ژن‌های AQP1 و MAPK و ژن‌های کلسی‌نورین می‌باشد. ژنوم لیشمانیا حاوی ۸۲۷۲ ژن کدکننده پروتیین می‌باشد که تنها ۳۶٪ از این ژن‌ها دارای عملکرد می‌باشند.[۱۰] در پژوهشی که توسط Kumar و همکاران انجام شد، میزان بیان ژن‌های MRPA و γ-GCS، AQP1، پروتئوم/ترانسکریپتوم، پروتیین شوک حرارتی ۸۳ (HSP83)، هیستون‌های H1, H2A, H4 و Mitogen-activated protein kinase 1 بررسی شد. نتیجه این بررسی تغییر قابل توجه در میزان بیان MRPA و H1 و H2A و H4 وγ-GCS و HSP83 مشاهده شد. در کل میزان بیان این ژن‌ها در برخی از ایزوله‌ها تغییر یافته ولی در بعضی ثابت ماند. در همه ایزوله‌های مقاوم به گلوکانتیم میزان بیان AQP1 افزایش یافت. هیچ ارتباط معناداری بین این ژن‌ها و اثر آن‌ها بر فنوتیپ ایزوله‌های L. donovani مشاهده نشد.

در ۶۰٪ از ایزوله‌های مقاوم، میزان بیان MRPA افزایش پیدا کرد. نوسان در میزان تیول با میزان مقاومت رابطه دارد. زیرا تیول باعث تغییر در میزان بیان γ-GCS در مسیر سنتز گلوتاتیون می‌شود. مطالعه فوق افزایش بیان RNAی γ-GCS در ۷۰٪ ایزوله‌ها مشاهده گردید. افزایش HSP83 عامل مقاومت به گلوکانیم است. MAPK1 واسطه مهم در انتقال سیگنال، تکثیر، پاسخ به استرس و آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوت عالی است. افزایش بیان هیستون‌های H1 H2A H4باعث مقاومت به گلوکانتیم می‌شود.[۱۱]

۳- عوامل آنزیمی: مطالعات گذشته مشخص کرد گلوکانتیم باعث مهار گلیکولیز و بتا اکسیداسیون اسید چرب می‌شود. بیماری‌زایی انگل با تکثیر فرم آماستیگوت در ماکروفاژها شروع می‌شود. با وجودی‌که فرم آماستیگوت و پروماستیگوت از نظر ژنتیکی یکسان می‌باشند، اما از نظر سایتولوژیک و مورفولوژیک و همچنین از نظر حساسیت به دارو متفاوتند.

با توجه به مکانیسم اثر گلوکانتیم احتمال می‌رود که اکسیداسیون اسیدهای چرب و گلیکولیز در انواع مقاوم تغییر یافته باشد، از این‌رو نیاز سلول به انرژی تغییر می‌یابد. این تغییرات به‌صورت کاهش ابعاد و افزایش رشد پدیدار می‌شود.[۱۲]

۴- جریان (انتشار) دارو: دو نوع ناقل ABC مسئول مقاومت چند دارویی Multi drug resistance (MDR) وجود دارد:

p-gp (p- گلیکوپروتیین) و پروتیین مرتبط با مقاومت چند دارویی Multi drug resistance-related protein (MRP).

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

جدول ۱: فراوانی مقاومت به گلوکانتیم در بیماری لیشمانیوز در نقاط مختلف دنیا

نوع لیشمانیوز	مکان	سال	درصد مقاومت
احشایی	هند[۱۳]	۲۰۰۰	٪۳۰-۶۰
احشایی	هند[۱۳]	۱۹۹۰	بیش از ٪۶۵
جلدی (تروپیکا)	کانادا[۱۴]	۲۰۱۲	٪۱۰۰
جلدی (تروپیکا)	مشهد[۱۵]	۲۰۰۶	٪۱۲
جلدی (تروپیکا)	مشهد[۱۶]	۲۰۰۶	٪۵/۳ سیستمیک ٪۱۰ موضعی ٪۶۰ توام
جلدی (تروپیکا)	بم[۱۷]	۱۳۸۷	٪۱۱/۱
جلدی	اصفهان[۷]	۱۳۸۴	٪۱۱/۶
جلدی (تروپیکا)	مشهد[۱۶]	۲۰۰۲	٪۹۴/۲
جلدی	اصفهان[۶]	۲۰۱۳	٪۳/۷ موضعی ٪۴/۷ سیستمیک ٪۳/۴ توام

جدول ۲: بررسی علل مقاومت به گلوکانتیم

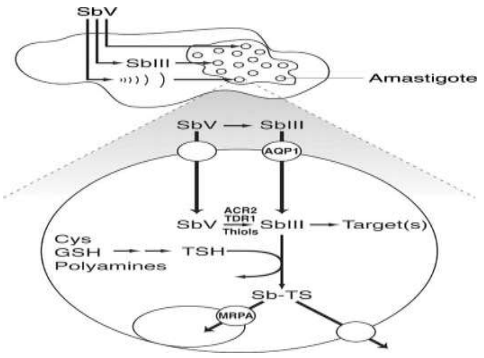
	خلاصه علل مقاومت به گلوکانتیم	توضیحات
۱	عوامل ژنی	ژن‌های مربوط به پروتیین‌های شوک حرارتی، مقاومت چندداروویی، پروتیین‌های متصل شونده به گلوتاتیون
۲	عوامل پروتیینی	پروتیین‌های انتقال دهنده دارو، یوبی کویتین، کینازها
۳	عوامل آنزیمی	آنزیم‌های مسیر گلیکولیز و بتا اکسیداسیون اسید چرب
۴	ناقلین عبور دارو	پروتیین مربوط به مقاومت چندداروویی (MRPA)، گلیکوپروتیین p، ناقلین کاست متصل به ATP (ABC)
۵	تغییر در تجمع دارو	کاهش جذب، تجمع و انتشار دارو
۶	درمان/ دارو	دوز ناکافی دارو، مهار فعال شدن دارو
۷	تیول متصل به گلوتاتیون	تیول با تولید گلوتامیل سیستئین سینتتاز (GCS) باعث حفاظت سلول در استرس اکسیداتیو می‌شود
۸	آپوپتوز	القای مرگ برنامه‌ریزی شده توسط متاکاسپاز
۹	تغییر اسکلت سلولی	تغییر در توبولین‌های میکروتوبول‌ها
۱۰	سیستم ایمنی میزبان	میزان لنفوسیت‌های CD_4^+

p-gp توسط ژن mdr-1 کد می‌شود و مسئول مقاومت به داروهای هیدروفوبیک می‌باشد (MDR). در لیشمانیا MRP با پروتیین همراه MDR همراهی می‌کند و شناخته‌شده‌ترین نوع MDR، MDR1 است. هر دو نوع MDR (MRP, p-gp) باعث ایجاد مقاومت دارویی می‌شوند. مطالعات انجام شده بین MDR1 و مقاومت به Daunorubicin و وین‌بلاستین ارتباط معناداری پیدا کردند، اما بین MDR1 و مقاومت به آنتیموان ارتباط مشخص نشد. از طریق آنالیز کل ژنوم لیشمانیا ۸ پروتیین هومولوگ متعلق به خانواده MRP1 کشف شد که مسئول مقاومت به فلزات و انتقال (Efflux) با واسطه تیول در سلول‌های پستانداران می‌باشد. دو عدد از این هشت پروتیین سبب مقاومت به آنتیموان در انگل می‌باشند. یکی به‌نام PGPA (همان پروتیین MRPA است) می‌باشد. MRPA لیشمانیا با MRPA

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

جدول ۳: ژن‌های مقاومت به گلوکانتیم[۱۸،۹]

نام ژن		عملکرد
TRPER	تریپاردوکسین پراکسیداز	حفاظت از انگل در برابر شرایط استرس اکسیداتیو
ARGG	آرژینو سوکسینات سنتتاز	بیماری‌زایی انگل
SKCRP	پروتیین کوچک کینتوپلاست	محرک مرگ برنامه‌ریزی شده سلول
MAPK	پروتیین کیناز فعال کننده میتوژن	دخیل در آپوپتوز
AQP1	آکوا پورین	کانال غشایی جهت ورود آنتیموان سه ظرفیتی
GSH1	گاماگلوتامیل سیستیین	آنزیمی در مسیر سنتز گلوتاتیون
MRPA	پروتیین چند دارویی	ناقل از نوع ABC برای انتقال کمپلکس آنتیموان سه ظرفیتی و تیول
P229	پروتیین ۲۲۹	ناشناخته
TRYR	تریپانوتیون ردوکتاز	احیای گروه دی‌سولفید در تریپانوتیون-توسط آنتیموان سه ظرفیتی مهار می‌شود
HSP83	پروتیین شوک حرارتی	جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول
14-3-3	پروتیین ۳-۳-۱۴	اتصال به پروتیین فسفریله در آپوپتوز
KMP11	پروتیین غشای کینتوپلاست	گلیکوپروتیین بزرگ غشایی فعال‌کننده ایمنی
MDR1	مقاومت چند دارویی	انتقال دارو
H4	هیستون ٤	اتصال به DNA انگل



شکل: مقاومت به آنتیموان پنج ظرفیتی در آماستیگوت لیشمانیا[۱۹]

پستانداران متفاوت است چون MRPA پستانداران باعث مقاومت به آنتیموان پنج ظرفیتی، روی و کلسیم نمی‌شود. MRPA در غشای وزیکول‌های غشای پلاسمایی قرار دارند. افزایش بیان MRPA نقش مهمی در مقاومت به آنتیموان به‌عهده دارد. دومین پروتیین مسئول مقاومت به آنتیموان، PRP1 می‌باشد. پروتیین دیگری کشف شده که مستقل از MRPA می‌باشد و مسئول مقاومت به آنتیموان می‌باشد. این پروتیین پمپ انتقال فلزات می‌باشد و همانند MRPA گروه تیول در GSH و TSH را شناسایی می‌کند و همراه با صرف انرژی سبب انتقال فلزات می‌گردد. مکانیسم عمل این پروتیین به‌طور کامل مشخص نشده ولی روشن است که در مقاومت به آنتیموان بی‌تاثیر است.[۱۹]

۵- تغییر در تجمع دارو: تغییر در میزان تجمع دارو که تحت تاثیر عواملی مانند افزایش برداشت گلوکانتیم از داخل سلول، کاهش تجمع دارو، کاهش جذب و انتشار دارو، مهار شدن دارو و مهار متابولیسم،[۲۰] کاهش غلظت دارو می‌باشد.

٦- درمان / دارو: Gorgl و همکارانش در یک مطالعه که به‌صورت In-vitro در مورد چگونگی مقاومت انگل‌های لیشمانیا نسبت به ترکیبات آنتیموان کار می‌کردند، به این نتیجه رسیدند که عدم پاسخگویی بیمار با ترکیبات آنتیموان به‌علت پیدایش سوش‌های مقاوم به انگل است. پژوهش‌های دیگر تأیید کننده این نظر است که بروز مقاومت به داروهایی از جمله ترکیبات آنتیموان، نتیجه درمان

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

ناقص یا ناکافی بیماران بوده است که در بعضی از آن‌ها باعث عود بیماری شده است. مطالعه دیگر نشان داد که سوش مقاوم انگل، قدرت بیماری‌زایی و تکثیر بیشتری نسبت به سوش حساس ندارد.[۲۱] نتایج مطالعه‌ای که توسط Mahmoodi و همکاران انجام شد نشان داد که سوش‌های جدا شده از بیماران در محیط کشت در مقابل مگلومین آنتیموان، که یک ترکیب پنج ظرفیتی است، به‌نسبت مقاومند و یا این ترکیب اثر ضد لیشمانیایی ناچیزی در محیط کشت دارد. ترکیب آنتیموان پنج ظرفیتی بایستی به ترکیب سه ظرفیتی احیا گردد تا بر انگل اثر داشته باشد. از طرفی در این مطالعه تمام سوش‌های L. tropica جدا شده از بیماران در محیط کشت و پس از ورود آن‌ها به ماکروفاژ و تبدیل به فرم آماستیگوتی، در مقابل پتاسیم تارتارات حساس بوده و غلظت مناسب این دارو (از ۱۰۰ تا ۲۰۰ µl/ml) باعث توقف رشد بیشتر انگل‌ها می‌گردد. ترکیبات آنتیموان سه ظرفیتی به‌دلیل اثرات سمی بیشتری که نسبت به ترکیبات پنج ظرفیتی دارند قابلیت از بین بردن انگل‌های بیشتری دارند.[۲۱]

۷- تیول: تیول باعث حفظ سلول در برابر استرس اکسیداتیو، اکسیدانت‌ها، فلزات سنگین و زنوبیوتیک‌ها می‌باشد. چون ترکیبات آنتیموان جزو عوامل استرس اکسیداتیو می‌باشند بنابراین بودن تیول عامل مهمی در مقاومت به آنتیموان می‌باشد. افزایش تیول، GSH، سیستیین، اسپرمیدین و TSH باعث بروز مقاومت به آنتیموان می‌گردد. تیول نقش مهمی در مقاومت به آنتیموان دارد چون باعث کاهش تبدیل sbV به sbIII می‌گردد.[۱۹] وجود تیول در سویه‌های مقاوم به گلوکانتیم گزارش شده است. مکانیسم اصلی مقاومت به گلوکانتیم، کاهش غلظت دارو، تکثیر ژن‌های مقاومت به دارو، تغییر در آنزیم‌های گلوکولیتیک (مانند فسفوفروکتوکیناز) و آنزیم‌های بتا اکسیداسیون اسید چرب و تغییر در تجمع (Accumulation) دارو گزارش شده است. همچنین در این مطالعه دلایل دیگری مانند تغییر در نفوذپذیری غشای انگل طی تغییر در پمپ غشایی وابسته به ATP و همچنین وجود یک ژن ٦ کیلوبازی در عنصر خارج کروموزومی به‌نام G-circle بیان شده است.[۲۲] تیول داخل سلولی متصل به گلوتاتیون–اسپرمیدین نقش مهمی در مقاومت دارد. تیول باعث مهار بیوسنتز گلوتاتیون شده و در نهایت منجر به عدم پاسخ آماستیگوت‌ها به گلوکانتیم می‌شوند. وجود بوتیونین سولفوکسیمین (BSO)، مهارکننده گاما گلوتامیل سیستیین سنتتاز در مسیر سنتز گلوتاتیون باعث مقاومت تروپیکا به گلوکانتیم می‌گردد. مطالعات نشان داده موتاسیون در ژنوم لیشمانیا سبب مقاومت به گلوکانتیم می‌گردد (متوسط و زیاد).[۱٦] همچنین آنزیم تریپانوتیون ردوکتاز و نیز ژن mrpa را در انگل‌های مقاوم شناسایی شده است. این سه فاکتور موجب افزایش برداشت و حذف دارو از داخل سلول انگل و در نتیجه مقاومت دارویی می‌گردد.[۲۳]

۸- آپوپتوز: مطالعات جدید نشان‌دهنده این است که روند آپوپتوز علاوه بر جانداران پرسلولی در تک‌یاخته‌های یوکاریوتی مانند خانواده کینتوپلاستیدا نیز رخ می‌دهد و این موجودات از این نوع مرگ در جهت کنترل جمعیت سلولی خود استفاده می‌کنند. تجویز برخی داروها موجب القای مرگ سلولی در انگل لیشمانیا می‌شود. خانواده کاسپازها آنزیم‌هایی هستند که در روند آپوپتوزیس جانداران پرسلولی نقش اساسی و با عملکرد آبشاری خود موجب ایجاد واکنش‌های آپوپتوزیس و در نهایت مرگ سلول می‌شوند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند ژن کاسپاز در انگل‌های لیشمانیا وجود ندارد، بلکه هومولوگ آن ژنی به‌نام متاکاسپاز است که در کینتوپلاست وجود دارد و از طریق میتوز به هسته منتقل می‌شود.[۲٤] پس از تبدیل sbV به sbIII، sbIII از طریق AQP1 وارد سلول شده و باعث القای PCD می‌گردد. پروتیینی به‌نام SKCRP14.1 (Small kinetoplastid calpain-related protein) به‌همراه چند پروتیین دیگر باعث قطعه‌قطعه شدن DNA می‌شوند و سرانجام باعث تغییر نفوذپذیری غشا و در معرض قرارگیری فسفاتیدیل سرین می‌شود.[۲۵]

۹- تغییر در اسکلت سلولی: میکروتوبول‌ها از توبولین‌های نوع آلفا، بتا و گاما ساخته شده که وظیفه حفظ شکل سلول، رشد و تمایز لیشمانیا را به‌عهده دارند. آرسنیت با تمایل بسیار بالا به توبولین‌ها متصل می‌شود و باعث مهار پلیمریزاسیون آن‌ها می‌گردد. آرسنیت و آنتیموان ممکن است باعث تغییر در پروتیین‌های اسکلت سلولی شوند. مطالعات اخیر نشان داده بیان آلفا توبولین‌ها در پروماستیگوت‌های تیپ وحشی و موتانت‌های آماستیگوت مقاوم به آرسنیت مشابه است. میزان فسفریلاسیون توبولین‌ها در موتانت‌های مقاوم به آرسنیت افزایش می‌یابد. توبولین‌ها نقش مهمی در مقاومت به فلزات دارند.[۱۹]

۱۰- سیستم ایمنی میزبان: فعالیت ضد لیشمانیایی پتامیدین‌ها، وابسته به T سل‌هاست و فعالیت ضد لیشمانیوزی آمفوتریسین B و

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

میلتفوسین، به T سل وابسته نیست. برای جلوگیری از بازگشت لیشمانیوز و کنترل این بیماری، نقش سلول‌های لنفوسیتی CD4 اهمیت بسزایی دارد. مطالعات انجام شده نشان داده که طول مدت مصرف داروهای آنتیموان بر درمان لیشمانیوز تاثیر دارد. تفاوت در میزان حساسیت گونه‌های لیشمانیا به داروها به‌علت تفاوت بیوشیمیایی و مولکولی گونه‌های مختلف است.[۲۰]

سایر مکانیسم‌ها: طریقه عملکرد ترکیبات آنتیموان و NO (نیتریک اکسید) مشابه است زیرا هر دو در شرایط استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند و عملکرد آن‌ها نیاز به آنزیم‌های مسیرهای انرژی و آپوپتوز دارد. همانند آنتیموان، نیتریک اکسید نیز باعث القای بیان پروتیین‌های استرس مثل HSP 65, 70, 81 می‌گردد. موتانت‌های L. infantum مقاوم به sbIII به ترکیبات نیتریک اکسید نیز مقاومند.[۱۹]

مکانیسم عمل و مواضع بروز مقاومت دارویی گلوکانتیم: پس از ۶۰ سال استفاده از گلوکانتیم، به‌تازگی مکانیسم عمل آن مشخص شده. تمام داروهای آنتیموان پنج ظرفیتی (sbV) باید به فرم سه ظرفیتی (sbIII) تبدیل شوند تا قدرت کشندگی داشته باشند. مکانیسم احیای sbV به sbIII هنوز مشخص نیست. در گلوتاتیون و تریپانوتیون، احیای sbV به sbIII تحت شرایط اسیدی و بدون دخالت آنزیم صورت می‌گیرد. بهترین شرایط برای این تبدیل pH=۵ و دمای ۳۷ °C است.

به‌تازگی دو آنزیم برای تبدیل sbV به sbIII کشف شده: ردوکتاز وابسته به تیول و هومولوگ گلوتاردوکسین وابسته به آرسنات ردوکتاز مخمری. آنزیم ردوکتاز وابسته به تیول، تترامر بوده و دارای دمینی حاوی گلوتاتیون ترانسفراز (GST) می‌باشد.[۱۹] آنزیم مطالعات ابتدایی بر روی مکانیسم عمل این دارو مشخص کرد که سدیم استیبوگلیکولات (sbV) از طریق مهار گلیکولیز و بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب مانع سنتز ماکرومولکول‌ها می‌شود، اما هنوز هدف اصلی این دارو مشخص نشده. sbIII باعث آپوپتوز و در نتیجه قطعه قطعه‌شدن DNA و انتقال فسفاتیدیل کولین به غشای پلاسمایی می‌گردد.[۲۰] sbIII در شرایط in-vitro سبب مهار تریپانوتیون ردوکتاز (TR) و گلوتاتیون سنتتاز می‌گردد. در عفونت‌های حیوانی، عملکرد sbV وابسته به‌سلول‌های T و سایتوکین‌ها می‌باشد. یکی از علل مقاومت انگل لیشمانیا به آنتیموان، کاهش تبدیل sbV به sbIII می‌باشد، در نتیجه ماکروفاژها در معرض مقدار کشنده sbIII قرار نمی‌گیرند. غلظت ۱ mg/ml از sbV هیچ اثری بر رشد ماکروفاژها ندارد، اما غلظت ۲۵ mg/ml از sbIII حدود ۵۰٪ از ماکروفاژهای THP-1 را از بین می‌برد.[۱۹]

ورود آنتیموان به داخل سلول: مکانیسم ورود آنتیموان پنج ظرفیتی (sbV) به‌طور دقیق مشخص نیست اما آرسنات پنج ظرفیتی (فلز همراه با sbV) از طریق ناقلین فسفات وارد سلول می‌شوند. sbV و sbIII از راه‌های متفاوتی وارد سلول می‌شوند. آرسنیک سه ظرفیتی باعث مهار تجمع sbIII می‌گردد اما بر روی sbV اثری ندارد. راه ورود sbIII و AsIII شبیه همدیگر می‌باشد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد sbIII از طریق AQP1 وارد سلول می‌گردد. بیان بیش از حد AQP1 سبب حساسیت زیاد انگل به sbIII می‌شود.[۱۹]

مکانیسم مقاومت به آنتیموان پنج ظرفیتی در لیشمانیا: بر اساس شکل ۲، ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی (sbV) وارد ماکروفاژ شده و همزمان می‌تواند وارد آماستیگوت شود و یا در سیتوزول به آنتیموان سه ظرفیتی (sbIII) تبدیل شود و سپس وارد انگل گردد. sbV می‌تواند بر روی مسیر سیگنالی سلول اثر کند و منجر به مرگ سلول گردد.

sbIII می‌تواند به اهداف سلولی متصل شود و یا با گروه تیول در سیستیین، گلوتاتیون و تریپانوتیون، کونژوگه شود. هنوز مشخص نیست که این واکنش با واسطه آنزیم‌ها انجام می‌شود یا خیر. در سلول‌های مقاوم به آنتیموان، میزان تریپانوتیون افزایش می‌یابد و سبب افزایش کونژوگاسیون دارو با فلز می‌گردد. کونژوگه‌های تیول–فلز یا از طریق ناقلین ABC (MRPA) وارد ارگانل می‌شود و یا از طریق انتشار و یا با واسطه انواع دیگر ناقلین ABC از سلول خارج می‌شوند.[۲۵] در سویه L. tarentolea مکانیسم حساسیت به آنتیموان کمی متفاوت از بقیه لیشمانیاهای بیماری‌زای پستانداران می‌باشد. مکانیسم اولیه مقاومت به آنتیموان، کاهش تجمع داروی فعال در سلول انگل می‌باشد. به‌طور کلی در مکانیسم مقاومت به آنتیموان عوامل مختلفی مانند کاهش تجمع دارو، کاهش جذب دارو، افزایش انتشار، مهار فعال شدن دارو و مهار متابولیسم دخیل می‌باشند.[۱۹]

در مقاومت طبیعی به آنتیموان، میزان تبدیل sbV به sbIII کاهش می‌یابد. مطالعات نشان داده میزان بیان γ-GCS در ماکروفاژهای میزبان تغییر می‌یابد و در نتیجه باعث کاهش غلظت GCS میزبان می‌گردد. با کاهش میزان AQP1، میزان ورود sbIII به داخل سلول نیز کاهش

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

می‌یابد. بنابراین علت مقاومت طبیعی به آنتیموان، کاهش غلظت داروی فعال در انگل می‌باشد. مکانیسم مقاومت به آنتیموان در بدن با شرایط آزمایشگاهی، بسیار متفاوت است.[۱۹]

مکانیسم مقاومت آنتیموان در شرایط آزمایشگاهی: sbV توسط کانال ناشناخته‌ای وارد ماکروفاژ می‌شود. sbIII از طریق کانال AQP1 وارد سلول می‌گردد. در سلول‌های مقاوم به sbIII میزان TSH به دلیل افزایش γ-GCS و Ornitine decarboxylase (ODC)، افزایش می‌یابد. TSH با sbIII کمپلکس تشکیل داده و از طریق MRPA و کانال‌های ناشناخته‌ی دیگر وارد می‌شود.[۱۹]

مکانیسم مقاومت آنتیموان در بدن: در شرایط آزمایشگاهی میزان ODC افزایش می‌یابد اما در بدن میزان ODC کاهش یافته و در نتیجه میزان سنتز تیول کاهش می‌یابد و در نهایت باعث مهار فعالسازی sbV می‌گردد. میزان بیان AQP1 کاهش یافته و در نتیجه باعث محدودیت در ورود sbIII به داخل ماکروفاژ می‌گردد. sbIII با تیول کونژوگه شده و از طریق کانال‌های ناشناخته‌ای از ماکروفاژ خارج می‌گردد.

روش‌هـای آزمایشگاهـی تشخیـص عوامل مقاومت به گلوکانتیم عبارتند از انواع Polymerase chain reaction, PCR (معمولی، Nested، Real-time و RAPD ....)، RFLP-CSGE با آنزیم 2D-E-sedul (الکتروفورز دو بعدی)، کشت در محیط‌های اختصاصی، Proteomics screens.[۲۶و۲۷]

از مهمترین علل مقاومت دارویی به این ترکیبات، عوامل ژنی، پروتیینی، آنزیمی، عوامل داخل سلولی مانند مسیرهای ورود و خروج دارو، آپوپتوز و تغیر اسکلت سلولی می‌باشند. در این بین علت اصلی مقاومت دارویی، کاهش غلظت دارو در سلول است و نتیجه آن کاهش جذب sbIII و کاهش بیان AQP1 و یا افزایش انتشار داروی فعال کونژوگه با تیول می‌باشد. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آتی جهت بررسی میزان شیوع عوامل ژنی موثر بر مقاومت دارویی ترکیبات آنتی موان در نواحی اندمیک لیشمانیوز جلدی در ایران همراه با تعیین نوع گونه انگل بر اساس روش‌های مولکولی و دقیق (مانند PCR) طراحی گردد. همچنین انجام مطالعاتی جهت بررسی جایگزین‌های درمانی-دارویی مناسب در صورت بروز مقاومت دارویی به ترکیبات آنتیموان ضرورت دارد.

References

1. Ramezani Y, Mousavi SGA, Bahrami A, Fereydooni M, Parsa N, Kazemi B. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Aran and Bidgol from April to September 2009. *Feyz* 2011; 15(3): 254-85. [In Persian].
2. Shamsi-Meymandi S, Eslam-manesh T, Dabiri Sh, Nadji M. The histopathological changes and immunohistochemical findings of acute, chronic nonlupoid and chronic lupoid types of cutaneous leishmaniasis. *J Kerman Univ Med Sci* 2010; 17(4): 281-96. [Persian].
3. World Health Organization. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1990; 793: 1-158.
4. Farahmand M, Nahrevanian H, Shirazi HA, Naeimi S, Farzanehnejad Z. An overview of a diagnostic and epidemiologic reappraisal of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(1): 17-21.
5. Parvizi P, Baghban N, Novin EA, Absavaran A. Detection, identification and molecular typing of Leishmania major in Phlebotomus papatasi from a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central of Iran. *Exp Parasitol* 2010; 124(2): 232-7.
6. Jaffary F, Nilforoushzadeh MA, Abdellahi L, Mortazaei S . Cutaneous Leishmaniasis Reinfection: Skin Disease and Leishmaniasis Research Center, Isfahan, Iran. *J Isfahan Med Sci* 2015; 33(341):1.[Persian]
7. Nilforooshzadeh MA , Ansari N, Derakhshan R, Siadat AH. Frequency of resistance to systemic meglumine antimoniate(Glucantime®) in acute cutaneous leishmaniasis: a cross sectional study. *Cell Tissue Res* 2008; 8(2) 1379 -1381 [prersian]
8. Nilforooshzadeh MA, Hejazi SH, Nabipour R. Topical Fluconazole Combined with Local Glucantime Injection Compared with Local Glucantime Injections in Treatment of Leishmaniasis. *J Isfahan Med Sci* 2011;28 (118). [Persian]
9. Jeddi F, Marry C, Aoun K, Harrat Z, et al. Heterogeneity of Molecular Resistantance Pattern in Antimony-Resistant Field Isolates of Leishmania Species from the Western Mediterranean Area. *AAC* 2014:58(8):4866-4874.
10. Zarean M, Maraghi S, hajaran H, Mohebali M, feiz-hadad MH, Asarzadegan MA. Comparison of proteome profiling of two sensitive and resistant field Iranian isolates of Leishmania major to Glucantime® by 2- dimensional electrophoresis. *Iran J Parasitol* 2015;10(1):19-29.
11. Kumar D, Singh R, Bhandari V, Kulshrestha A, Negi NS, Salotra P. Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of Leishmania donovani. *Parasitol Res* 2012; 111:223–230.
12. Meimandi M, Dabiri S, Bahreini M. The effect of allopurinol on glucantime-resistant Leishmania Tropica promastigotes. *J Guilan med sci* 2001;44(11). [persian]
13. Sundar S, More DK, Singh MK, Sharma S,Makharia A, Kumar PC, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 2000; 31(4): 1104-1107.
14. Plourde M, Coelho A, Keynan Y, Larios OE, Ndao M, Ruest A, Roy G, Rubinstein E, Ouellette M. Genetic Polymorphisms and Drug Susceptibility in Four Isolates of Leishmania tropica Obtained from Canadian Soldiers Returning from Afghanistan . *PLOS* 2012 ; 6 (1) :1463.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

15. Talari SA, Kazemi B, Hooshyar H, Alizadeh R, Arbabi M, Mousavi GA, Talari MR, Nikyar HR, Sobhani A. Identification of mutation for drug resistance gene in cutaneous leishmaniasis. *KAUMS* 2012; 16, 3: 235-239.
16. Hadighi R, Mohebali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime Treatment in Iranian Cutaneous Leishmaniasis due to Drug-Resistant Leishmania tropica Parasites. *PLoS Medicine* 2006 ; 3 (5)e:162
17. pour R, Sharifi I, Kazemi B,Zarean M. Identification of Nonresponsive Isolates to Glucantime in Patients with Cutaneouse Leishmaniasis in Bam. *JKMU* 2010;18;2. [Persian]
18. Adaui V, Schnorbusch K, Zimic M, Gutierrez A, Decuypere S, Vanaerschot M, Doncker SD, Maes I, Lanos-cuentas AS, Chappuis F, Arevalo J, Dujardin JC. Comparison of gene expression patterns among Leishmania braziliensis clinical isolates showing a different in vitro susceptibility to pentavalent antimony. Parasitology 2011; 138: 183–193.
19. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, smith JD, Ouellette M. A Proteomics Screen Implicates HSP83 and a Small Kinetoplastid Calpain-related Protein in Drug Resistance in Leishmania donovani Clinical Field Isolates by Modulating Drug-induced Programmed Cell Death. MCP 2006;17.
20. Simon L. Croft S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. review 2006; 111–126.
21. Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(1):117-26.
22. Flora E. Arana, Jose´ M. Pe´rez V, Repetto Y, Morello A, Castanys S, Gamarro F. Involvement of Thiol Metabolism in Resistance to Glucantime in Leishmania Tropica. Biol Pharmacol 1998;56:1201-8.
23. Karima El, Fadili, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Nancy G, Papadopoulou B, Le´gare´D, Ouellette M. Role of the ABC Transporter MRPA (PGPA) in Antimony Resistance in Leishmania infantum Axenic and Intracellular Amastigotes. *J Virol* 2005;1988-93.
24. Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ* 2008; 15:113–122.
25. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, Ouellette M. A Proteomics Screen Implicates HSP83 and a Small Kinetoplastid Calpain-related Protein in Drug Resistance in Leishmania donovani Clinical Field Isolates by Modulating Drug-induced Programmed Cell Death. *MCP* 2006; 17.
26. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug safty* 2004;7: 257–266.
27. Motazedian MH, Karamian M, Ardehali S, Hanjani F. Characterization of Leishmania Parasites from Archived Geimsa-stained Slides Using Nested Polymerase Chain Reaction. *J Med Res* 2003;2(4). [persian]

TUMJ Tehran University Medical Journal, September 2017; Vol. 75, No. 6: 399-407 Review Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 1:41 IRST on Sunday December 16th 2018

Review of the prevalence and causes of antimony compounds resistance in different societies: *review article*

Fariba Jaffary M.D., Ph.D.[1,2]
Latifeh Abdellahi Ph.D Student[1*]
Mohammad Ali Nilforoushzaheh M.D.[2]

1- Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Alzahra Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2- Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Alzahra Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Tel: +98- 31- 37923929
E-mail: latifeabdellahi@yahoo.com

Abstract

Received: 08 Apr. 2017 Revised: 10 Sep. 2017 Accepted: 21 Sep. 2017 Available online: 22 Sep. 2017

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic parasitic disease of major health impact in many parts of the world and is caused by several species of the protozoan parasite Leishmania. Antimonial compounds (i.e glucantime and pentostam) are the first-line treatment for cutaneous leishmaniasis with emerging drug resistance as a problem. The control of Leishmania is further complicated by the emergence of drug-resistant parasites. In the clinical settings, resistance to SbV containing drugs is now well established and it was found to occur in South America, Europe, the Middle East and most notably in India. Clinical resistance to organic pentavalent antimonials, in the form of sodium stibogluconate (pentostam) or N-methylglucamine antimoniate (glucantime), has long been recognized. However, it is unknown whether the clinical failure of chemotherapy is attributable to the development of drug resistance mechanisms in the parasite or to a variety of host factors that might also contribute to low drug response. Reported rate of drug-resistance to antimonial compounds in Iran varies from 9.4% to 94.2% and there is not any comprehensive study on this issue. Indeed, in the endemic region treatment with SbV fails in more cases; thus, in general patients infected with resistant parasites are unresponsive although exceptions have been reported. This article aims to review the mechanisms of drug resistance to these compounds. The main resistance factors include genetical, enzymatic, intracellular (such as apoptosis and cytoskeleton changes) and resistance proteins. Also, mechanisms related to drug transport and intracellular activation are discussed. Various methods of drug resistance detection such as culture and molecular methods (i.e polymerase chain reaction) are reviewed. Although the exact mechanism of action glucantime is not clear, it seems that protein and gene factors involved in cellular drug entry are the main causes of drug resistance. Cross-sectional studies on meglumine antimoniate resistance in endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Iran are highly recommended. Also, studies for evaluation of alternatives therapies for antimonial resistant cases are required.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, drug resistance, prevalence.