Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.14, No.3, Autumn 2014, Pages 257-265

In Vitro Study on effects of Amiodarone and Ketoconazole on *Leishmania infantum*

Razi Jalali MH[1*], Bahrami S[1], Najafzadeh H[2], Asadi Z[3]

[1] Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Department of Basic Sciences , Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Department of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
*Corresponding Author. Tel: +989166140371 Fax: +986113360807 E-mail: mh.jalali@scu.ac.ir

Received: 5 Feb 2014 Accepted: 18 Aug 2014

ABSTRACT

Background & objectives: The leishmaniases are considered among the major infectious diseases affecting public health in several regions. There are many chemical agents which are effective in treatment of visceral leishmaniasis. But, overall treatment of visceral leishmaniasis is often difficult. Thus, identification of new chemotherapeutic agents is important for treatment of disease. Since targeting of the ergosterol synthesis pathway of *Leishmania* may be useful therapeutically, the aim of this study was to investigate the effect of alone or in combination of amiodarone and ketoconazole on *Leishmania infantum*.

Methods*:* To obtain logarithmic promastigotes of *L. infantum*, the parasites were cultured in BHI medium with FCS 10% together with antibiotics of penicillin and streptomycin and incubated at 24° C. Amastigote forms were obtained in BHI medium supplemented with 20% FCS at pH of 5.5 which incubated in 37° C. *L.infantum* susceptibility to amiodarone and ketoconazole was evaluated by proliferation of parasites in the absence or presence of these drugs with MTT assay. For evaluation of antiproliferative synergism against promastigotes and axenic amastigotes, fractional inhibitory concentrations (FIC) were calculated. An isobologram curve was constructed too.

Results: Amiodarone produced a marked reduction in the viability of *L.infantum* promastigotes and axenic amastigotes. On the other hand ketoconazole induced a dose dependent effect on the parasites proliferation for promastigotes and axenic amastigotes. When the drugs were used in combination, the results indicated clear synergistic as shown by a concave isobologram and FIC value.

Conclusion: The present study represents the evidence that the combination of amiodarone plus ketoconazole acts synergistically in controlling *L. infantume* in vitro. It is possible that amiodarone could be used in combination with ketoconazole to combat infection at low doses, thus reducing its side effects such as cardiotoxicity, thyroid dysfunction and pulmonary fibrosis.

Keywords: Amiodarone, Ketoconazole, *Leishmania infantum, In Vitro*

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

بررسی اثر آمیودارون و کتوکونازول بر انگل *لیشمانیا اینفانتوم* در شرایط برون‌تنی

محمد حسین راضی جلالی*[۱]، سمیه بهرامی[۱]، حسین نجف زاده[۲]، زینب اسدی[۳]

[۱] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران [۲] گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران [۳] گروه انگل‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۶۶۱۴۰۳۷۱ فاکس: ۰۶۱۱۳۳۶۰۸۰۷ پست الکترونیک: mh.jalali@scu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوزیس از جمله بیماری‌های عفونی مهم و موثر بر سلامت عمومی در مناطق مختلف است. ترکیبات شیمیایی مختلفی علیه لیشمانیوز موثر می‌باشند، اما بطور کلی درمان لیشمانیوز احشایی اغلب دشوار است. بنابراین شناسایی عوامل شیمیایی جدید برای درمان و کنترل بیماری مهم است. از آنجایی که مسیرهای سنتز ارگوسترول یکی از اهداف درمانی انگل‌های *لیشمانیا* می باشند، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات مجزا و همزمان دو داروی آمیودارن و کتوکونازول بر روی انگل *لیشمانیا اینفانتوم* بوده است.

روش کار: برای به دست آوردن فاز لگاریتمی، انگل در محیط BHI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله، آنتی بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده و در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. فرم‌های مشابه اماستیگوت‌ها در محیط BHI با ۲۰٪ سرم جنین گوساله و pH = ۵/۵ کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. حساسیت *لیشمانیا اینفانتوم* به آمیودارون و کتوکونازول با بررسی تکثیر انگل در حضور یا عدم حضور داروها با روش MTT ارزیابی شد. برای ارزیابی اثرات سینرژیستی دو دارو بر ضد پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسنیک، FIC محاسبه شد و منحنی ایزوبولوگرام آن رسم گردید.

یافته‌ها: آمیودارون باعث کاهش زنده‌مانی پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسنیک *لیشمانیا* گردید. از طرف دیگر کتوکونازول نیز اثر وابسته به دوز داشته و بر روی پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسنیک موثر بود. در استفاده همزمان دو دارو با بررسی مقدار FIC و منحنی مقعر ایزوبولوگرام مشخص گردید که دو دارو دارای اثرات سینرژیستی بوده و اثر یکدیگر را کاملا تقویت می‌کنند.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که دو داروی آمیودارون و کتوکونازول به تنهایی و به صورت ترکیبی در شرایط برون تنی بر انگل *لیشمانا اینفانتوم* موثر می‌باشند و ممکن است ترکیب دو داروی آمیودارون و کتوکونازول بتواند در درمان لیشمانیوز احشایی موثر باشد. از طرف دیگر با ترکیب این دو دارو نه تنها از دوز دارو کاسته خواهد شد بلکه از اثرات جانبی داروی آمیودارون مانند اختلالات قلبی، اختلالات تیروئید و فیبروز ریوی کاسته خواهد شد.

کلمات کلیدی: آمیودارون، کتوکونازول، *لیشمانیا اینفانتوم*، شرایط برون تنی

دریافت: ۹۲/۱۱/۱۶ **پذیرش:** ۹۳/۵/۲۷

مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری عفونی انگلی است که توسط تک‌یاخته‌ای به نام *لیشمانیا* ایجاد می‌شود و دامنه‌ی شدت آن از یک زخم پوستی با التیام خودبخودی تا حالت احشایی شدید متغیر است [۱]. بروز سالیانه جهانی آن ۱/۵ تا ۲ میلیون نفر و شیوع آن حدود ۱۲ میلیون نفر گزارش شده است که حدود ۵۰۰ هزار مورد احشایی و بقیه مربوط به لیشمانیوز جلدی و مخاطی- جلدی می‌باشد [۲]. لیشمانیوز احشایی، شدیدترین فرم لیشمانیوز بوده و موارد علامت‌دار آن در صورت عدم درمان اغلب منجر به مرگ می‌شود. ایران جزءِ مناطق اندمیک لیشمانیوز احشایی

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

بوده و شمال غرب و مناطق جنوبی ایران کانون‌های اندمیک بیماری را در کشور تشکیل می‌دهند [۳]. عامل بیماری در این مناطق *لیشمانیا اینفانتوم* بوده و ناقل آن پشه‌های خاکی از جمله *فلبوتوموس ماژور* به عنوان ناقل اصلی می‌باشد. اغلب بیماران را افراد زیر ۱۲ سال تشکیل می‌دهند. سگ و سگ‌سانان مخازن قطعی *لیشمانیا اینفانتوم* هستند [۵،٤]. امروزه داروهای شیمیایی خصوصا ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان در درمان انواع مختلف لیشمانیوز بکار می‌رود، اما شواهد و گزارش‌های متعددی از عدم پاسخ به درمان چه در مورد فرم جلدی و چه احشایی ایجاد شده به‌وسیله گونه‌های مختلف انگل *لیشمانا* در نقاط مختلف دنیا موجود می‌باشد. علل عدم پاسخ به درمان شامل تاخیر در تشخیص، درمان و دوره طولانی بیماری، قصور در پیروی از دارودرمانی توصیه شده توسط سازمان جهانی بهداشت، درمان منقطع با دوز پایین، کاربرد دارو توسط کارکنان پزشکی ناکارآمد، کیفیت پایین دارو و درمورد بیماری کالاآزار، همراه بودن آن با بیماری ایدز می‌باشد [۶]. همچنین در بسیاری از کشورها مصرف داروهای آنتی‌موان به علت وجود اثرات جانبی بر روی کلیه، قلب، و سیستم کبدی و همچنین مقاومت دارویی محدود گردیده و موجب شده تا محققین در پی استفاده از داروهای جایگزین گردند. بنابراین مطالعه درمورد یافتن داروهای جایگزین در درمان لیشمانیوز احشایی از اهمیت برخوردار است [۸،۷]. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات مجزا و همزمان دو داروی آمیودارون و کتوکونازول بر روی پروماستیگوت و اماستیگوت‌های اکسنیک انگل *لیشمانیا اینفانتوم* می‌باشد. داروی آمیودارون یک آنتی‌آریتمیک کلاس III می‌باشد که به طور معمول در درمان کاردیومیوپاتی‌ها استفاده می‌شود. اخیراً مشخص گردیده است که این دارو با اختلال در هموستاز کلسیم و ممانعت از سنتز ارگوسترول اثرات ضد قارچی و ضد انگلی نیز دارد [۹]. داروی کتوکونازول نیز جزء تری‌آزول‌ها بوده و در درمان عفونت‌های قارچی از طریق اختلال در سنتز ارگوسترول موثر می‌باشد [۱۰]. در مطالعه‌ی حاضر اثرات مجزا و توام دو داروی مذکور بر روی پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسنیک انگل *لیشمانیا اینفانتوم* بررسی شد.

روش کار

کشت انگل:

سوش استاندارد *لیشمانیا اینفانتوم* توسط محبعلی و همکاران از یک قلاده سگ مبتلا به لیشمانیوز احشائی در منطقه کردان کرج جدا شده و با استفاده از روش های مولکولی (PCR-RFLP,Sequencing) و ایزوآنزیم گونه و سویه آن (MCAN/IR/07/Moheb-gh) ثبت گردید و در حال حاضر در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز نگهداری می گردد. برای این مطالعه سوش استاندارد ذکر شده از دانشکده پزشکی شیراز تهیه گردید. انگل در محیط BHI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله و ۱٪ پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شد. زمانیکه تعداد انگل‌ها به حداقل یک میلیون انگل در میلی‌لیتر رسید کشت انبوه آن آغاز گردید. برای تولید اماستیگوت‌های اکسنیک محیط‌های حاوی ۲ میلیون پروماستیگوت را سانتریفوژ کرده و بعد طبق روش Bahrami و همکاران، به رسوب محیط BHI که pH آن با اسید کلریدریک به ۵/۵ رسیده و حاوی ۲۰٪ سرم جنین گوساله و ۱٪ پنی سیلین و استرپتومایسین بوده اضافه کرده و نهایتا" در فلاسک-های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند [۱۱]. بدین ترتیب با افزایش دمای انکوباسیون و اسیدی کردن محیط زندگی انگل، پروماستیگوت‌ها به اماستیگوت‌های اکسنیک تبدیل شدند.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

مجاورسازی انگل با غلظت‌های مختلف دو دارو:
هر کدام از اشکال کشت شده‌ی انگل با غلظت 10^6 در میلی‌لیتر به محیط BHI تلقیح شده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲٤ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. سپس، غلظت‌های مختلف هر یک از داروهای آمیوداروون و کتوکونازول (تهیه شده از شرکت سیگما) به طور مجزا به محیط کشت حاوی انگل‌های در حال رشد اضافه گردید. جهت تهیه‌ی غلظت‌های داروها از DMSO[1] به عنوان حلال استفاده شد، بطوریکه در مداخلات غلظت آن بیش از ۰/۵٪ نگردید. پس از رقیق‌سازی آمیوداروون، پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسنیک انگل *لیشمانیا* با دوزهای ۱، ۲، ٤ و ۸ میکرومولار مورد آزمایش قرار گرفتند. همچنین برای داروی کتوکونازول دوزهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/٤، ۰/۵ و ۰/۶ میکرومولار تهیه و پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسنیک به طور مجزا با آنها مجاور گردیدند. پس از گذشت ٤۸ ساعت، میزان زنده‌مانی انگل با استفاده از روش رنگ سنجی MTT[2] مورد بررسی قرار گرفت.

روش MTT
برای این منظور میکروتیوب‌های حاوی انگل و محیط کشت که ٤۸ ساعت ازمجاورت آنها با دوزهای مختلف دارو گذشته بود با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده، مایع رویی به آرامی برداشته و پس از آن ۵۰ میکرولیتر از MTT که با غلظت‌های ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS[3] تهیه شده بود به هر میکروتیوب اضافه گردید. پس از چند بار پیپت کردن، رسوب ازمیکروتیوب‌ها جمع‌آوری و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. یک چاهک شاهد که شامل محیط کشت و یک چاهک به عنوان کنترل که شامل انگل و حلال بود، در نظر گرفته می شد. پلیت به مدت ۳ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور گذاشته شد. بعد از پایان انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به عنوان متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد. پلیت با دست مخلوط شد و پس از چند دقیقه دانسیته نوری پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از خوانشگر الایزا خوانده شد. درصد مهاری ناشی از ۳ بار تکرار محاسبه شده و سپس میانگین درصد کشندگی ۳ بار انجام تست از انحراف معیار جهت مشخص شدن اختلاف بین داده‌ها در تکرار انجام تست به کمک نرم‌افزار SPSS محاسبه گردید. ضمناً IC50 (غلظتی که موجب مهار رشد ۵۰٪ انگل‌ها شود) و MIC (غلظتی که تمام انگل از بین رفته باشد) داروها با استفاده از نرم افزار SPSS 15 و آنالیز رگرسیون خطی بدست آمد.

بررسی کنش متقابل دو داروی آمیوداروون و کتوکونازول
برای بررسی اثر متقابل دو داروی آمیوداروون و کتوکونازول از روش Halender و همکاران استفاده شد [۱۲]. در این روش برای بررسی اثر متقابل دو دارو از FIC[4] و منحنی ایزوبولوگرام استفاده می‌شود. برای بدست آوردن FIC، از فرمول زیر استفاده می‌شود:

FIC= (MIC combination A/MIC Alone A) + (MIC combination B/MIC Alone B)

در این فرمول A غلظت داروی آمیوداروون و B غلظت داروی کتوکونازول می‌باشد. به عبارتی FIC تقسیم شدن غلظتی از دارو که به صورت ترکیب با داروی دیگر استفاده می‌شود بر غلظتی است که خود به تنهایی دارای همان اثر مورد نظر می‌باشد. چنانچه مجموع FICهای بدست آمده برابر ۱ شوند آن دو دارو دارای اثر متقابل افزایشی می‌باشند. درصورتیکه مجموع FICهای بدست آمده از ۱ کمتر باشند دو دارو اثر سینرژیستی و

[1] Dimethyl sulfoxide
[2] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide
[3] Phosphate buffered saline
[4] Fraction Inhibitory Concentration

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

چنانچه مجموع FIC های بدست آمده بیشتر از ۱ باشند دو دارو دارای اثر آنتاگونیستی می‌باشند. برای رسم منحنی ایزوبولوگرام نیز در ابتدا با وصل کردن غلظت‌های دو دارو که بصورت تکی دارای اثرات مورد نظر می‌باشند منحنی پیشگو رسم گردیده و سپس با وصل کردن غلظت‌های ترکیبی دو دارو با یکدیگر نیز منحنی ایجاد می‌گردد که به آن ایزوبول گفته می‌شود. اگر ایزوبول به موازات منحنی پیش‌گو باشد اثر این دو دارو افزایشی، چنانچه منحنی ایزوبول به صورت مقعر و زیر منحنی پیشگو باشد، دارای اثر سینرژیستی و اگر بالای منحنی پیشگو باشد دارای اثرات آنتاگونیستی می‌باشد [۱۳]. برای رسم منحنی ایزوبولوگرام و بررسی FIC، طبق روش Halender و همکاران دو برابر غلظت MIC داروها محاسبه شده و پس از آن به دلخواه ترکیب‌هایی از دو دارو درنظر گرفته شد و نهایتا تا سه مرحله، رقیق سازی گردیدند [۱۲]. درنهایت کمترین غلظتی که باعث مرگ ۱۰۰ درصدی انگل شده بود انتخاب ودر فرمول FIC بکار گرفته شد و نهایتا منحنی ایزوبولوگرام آن رسم گردید.

یافته ها

الف- اثر غلظت‌های مختلف داروی آمیودارون بر روی انگل *لیشمانیا اینفانتوم*

با افزایش دوز آمیودارون درصد کشندگی دارو روی مراحل پروماستیگوت و اماستیگوت آکسنیک افزایش یافت. جدول ۱ درصد کشندگی دوزهای مختلف دارو را با استفاده از روش MTT نشان می‌دهد.

ب- اثر غلظت‌های مختلف داروی کتوکونازول بر روی انگل *لیشمانیا اینفانتوم*

با افزایش دوز کتوکونازول درصد کشندگی دارو روی مراحل پروماستیگوت و اماستیگوت آکسنیک افزایش یافت. جدول ۲ درصد کشندگی غلظت‌های مختلف دارو را با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT گزارش می‌دهد.

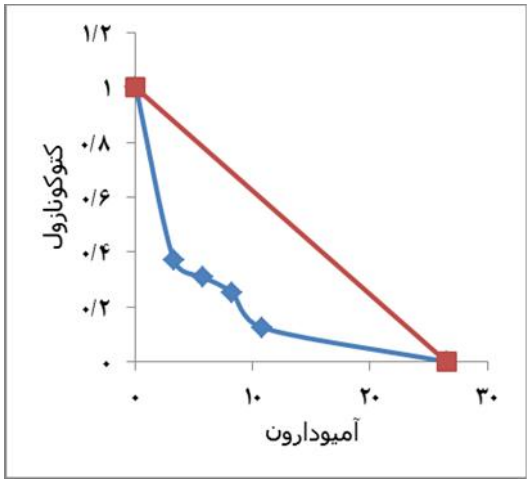
با استفاده از فرمول خط **IC50 و MIC** دو داروی کتوکونازول و آمیودارون در ۲ مرحله پروماستیگوت و اماستیگوت آکسنیک محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۳ آمده است.

جدول۳- IC50 و MIC محاسبه شده برای دو داروی آمیودارون و کتوکونازول بر روی مراحل مختلف انگل *لیشمانیا اینفانتوم* با استفاده از روش MTT

	آمیودارون (µM)		کتوکونازول (µM)	
	IC50	MIC	IC50	MIC
پروماستیگوت	۹	۲۶/۵	۰/۳۵	۱
اماستیگوت اکسنیک	٤/٤٥	۱۲	۰/۳۶	۰/۸۶

ج- نتایج کنش متقابل دو داروی آمیودارون و کتوکونازول

با توجه به نتایج بدست آمده از روش MTT، در چهار غلظت ترکیبی (۰/۱۲۵ و ۱۰/۷۵)، (۰/۲۵ و ۸/۲۵)، (۰/۳۱ و ۵/۷۵) و (۰/۳۷ و ۳/۲۵) میکرومولار داروها ۱۰۰٪ پروماستیگوت ها از بین رفته بودند. میانگین FIC های این غلظت‌ها ۰/۵۲ به دست آمد که چون این عدد کمتر از ۱ می‌باشد نشان می‌دهد این دو دارو دارای اثر سینرژیستی می‌باشند (نمودار ۱).



نمودار ۱. منحنی ایزوبولوگرام دو داروی آمیودارون و کتوکونازول در مرحله‌ی پروماستیگوتی

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

جدول ۱. اثر کشندگی غلظت‌های مختلف آمیوداروون بر روی مراحل مختلف انگل *لیشمانیا اینفانتوم* با استفاده از روش MTT.

مرحله‌ی انگل	غلظت‌های مختلف دارو بر حسب(µM)			
	۱	۲	٤	۸
پروماستیگوت	۲۶/۷±۱۱/۱٤	٤٥/۷۸±۶/۱٥	٥۱/۳۷±٥/۳۱	٥۸/٤۷±۷/۱
اماستیگوت اکسنیک	۲۱/۷۲±۷/۳۳	٤۱/٥۲±۷/٥۶	٤٥/۰۷±۳/۸٥	۷۳/۱۹±۳/۳۷

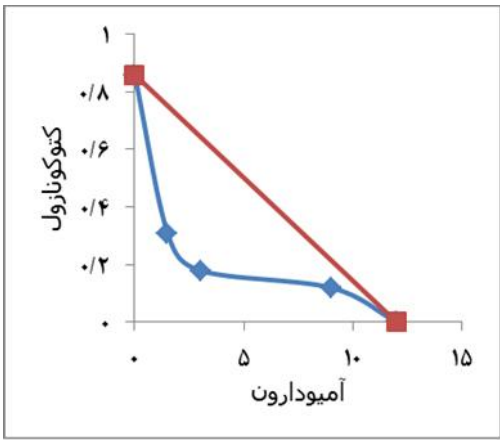
نتایج به صورت میانگین در صد کشندگی± انحراف معیار ارائه شده است.

جدول ۲. اثر کشندگی غلظت‌های مختلف داروی کتوکونازول بر روی مراحل مختلف انگل *لیشمانیا اینفانتوم* با استفاده از روش MTT

مرحله‌ی انگل	دوزهای مختلف داروی کتوکونازول بر حسب (µM)					
	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/٤	۰/٥	۰/۶
پروماستیگوت	۲۳/۷٥±٤/۳۲	٤٤/٥۶±٥/۲٤	٤۷/۸۱±٥/۸۶	٥۶/۰٤±٥/۸۳	۶۱/٥۲±۲/۶	۶٥/۹۸±٥/٥
اماستیگوت اکسنیک	۱۹/۶۹±٤/۰٥	۳۶/۷٥±٤/٤٥	٤۲/۰۳±٤/۰۷	٥۶/٤٤±٥/۰۱	٥۸/۸۸±۲/۶۲	۷٤/۱۱±۱/۸٥

نتایج به صورت میانگین در صد کشندگی± انحراف معیار ارائه شده است.

با توجه به نتایج حاصل از شمارش و MTT در سه غلظت ترکیبی اماستیگوت آکسنیک (۰/۱٥ و ۰/۷٥) و (۰/۱۸ و ۳) و(۰/۳۱ و ۱/٥) میکرومولار ۱۰۰٪ انگل‌ها از بین رفته بودند. میانگین FIC های این غلظت‌ها ۰/۶ شد. بنابراین چون این عدد کمتر از ۱ است، این دو دارو در این مرحله نیز دارای اثر سینرژیستی می‌باشند (نمودار ۲).



نمودار ۲. منحنی ایزوبولوگرام دو داروی آمیوداروون و کتوکونازول در مرحله‌ی اماستیگوت اکسنیک

بحث

داروهای شیمیایی بیشترین اثر را در درمان علیه لیشمانیوز دارد. بعلت نبود واکسن موثر، اولین مرحله درمان در فرم‌های مختلف لیشمانیوز، استفاده از ترکیبات آنتی‌موان ۵ ظرفیتی مانند گلوکانتیم و پنتوستام است. شواهد و گزارشات متعددی از عدم پاسخ به درمان چه در مورد فرم جلدی و چه احشایی و یا سایر فرم‌های ایجاد شده به وسیله گونه‌های مختلف انگل *لیشمانیا* در نقاط مختلف دنیا موجود می‌باشد. علل عدم پاسخ به درمان در کل شامل تاخیر در تشخیص، درمان و دوره طولانی بیماری، قصور در پیروی از دارودرمانی توصیه شده توسط سازمان بهداشت جهانی، درمان منقطع با دوز پایین، کیفیت پایین دارو و درمورد بیماری کالاآزار همراه بودن آن با بیماریHIV می‌باشد [۱٤]. در سالهای اخیر ظهور لیشمانیاهای مقاوم به گلوکانتیم در ایران دیده شده است [۱٥]. Khadem Erfan و همکاران کاهش تنظیم کلسینورین در انگل *لیشمانیا اینفانتوم* را از عوامل ایجاد مقاومت به گلوکانتیم دانستند [۱۶]. Kazemi Rad و همکاران برای اولین بار نشان دادند که افزایش تنظیم پروتئین تیروزین فسفاتاز و فسفو گلیسرات کیناز در *لیشمانیا تروپیکا*های مقاوم به درمان مشاهده می‌گردد [۱۷]. از طرفی در بسیاری از کشورها مصرف داروهای آنتی‌موان به علت وجود اثرات جانبی بر روی کلیه، قلب و سیستم کبدی و همچنین مقاومت دارویی محدود گردیده و موجب شده تا محققین در پی استفاده از داروهای جایگزین گردند [۸،۷]. بنابراین مطالعه در مورد یافتن داروهای جایگزین در درمان لیشمانیاز احشایی از اهمیت فراوانی برخوردار است. بهمین دلیل هدف از مطالعه ی حاضر بررسی اثرات مجزا و همزمان دو

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

داروی آمیودارون و کتوکونازول بر روی انگل لیشمانیا *اینفانتوم* بوده است. داروی آمیودارون یک آنتی آریتمیک کلاس III می‌باشد و به طور معمول در درمان کاردیومیوپاتی‌ها استفاده می‌گردد. همچنین اخیرا مشخص گردیده است که این دارو با اختلال در هموستاز کلسیم و ممانعت از سنتز ارگوسترول اثرات ضد قارچی و ضد انگلی نیز دارد [۹]. داروی کتوکونازول نیز جز تری‌آزول‌ها بوده و در درمان عفونت های قارچی از طریق اختلال در سنتز ارگوسترول موثر است. لازم به ذکر است که مهمترین استرول در خانواده ی تریپانوزوماتیده ارگوسترول می‌باشد [۱۰]. در مطالعه‌ی حاضر اثرات مجزا و توام دو داروی مذکور بر روی پروماستیگوت‌ها و اماستیگوت‌های اکسنیک انگل *لیشمانیا اینفانتوم* بررسی گردید. همان‌گونه که در قسمت نتایج بیان گردید برای داروی آمیودارون IC50 حدود ۹ میکرومولار، MIC حدود ۲۶/۵ میکرومولار برای پروماستیگوت و IC50 حدود ٤/٤٥ میکرومولار و MIC حدود ۱۲ میکرومولار برای اماستیگوت‌های اکسنیک محاسبه گردید. همچنین برای داروی کتوکونازول برای پروماستیگوت و اماستیگوت اکسنیک به ترتیب IC50 حدود ۰/۳۵، ۰/۳۶ میکرومولار و MIC حدود ۱، ۰/۸۶ میکرومولار به دست آمد. در مورد تاثیر داروی کتوکونازول بر روی گونه‌های مختلف *لیشمانیا* نتایج متغیری وجود دارد. در مطالعه‌ای که بر روی حساسیت گونه‌های مختلف انگل *لیشمانیا* به کتوکونازول انجام گرفته است انگل‌های *لیشمانیا دونووانی*، *لیشمانیا برازیلینسیس*، *لیشمانیا آمازونسیس* نسبت به *لیشمانیا ترویپکا*، *لیشمانیا ماژور*، *لیشمانیا اتیوپیکا*، و*لیشمانیا مکزیکانا* حساس‌تر بودند [۲]. شواهد و گزارشات متعددی از عدم پاسخ به درمان چه در مورد فرم جلدی و چه احشایی و یا سایر فرم‌های ایجاد شده به وسیله گونه‌های مختلف انگل *لیشمانیا* در نقاط مختلف دنیا موجود می‌باشد. Berman برای درمان لیشمانیوز جلدی و احشایی از مشتقات ایمیدازول به نام های کتوکونازول، ایتراکونازول و فلوکونازول استفاده کرد [۱۸]. در مطالعه Navin کتوکونازول به مقدار ۶۰۰ میلی گرم روزانه به مدت ۲۸ روز در درمان لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیای مکزیکی موثرتر از سدیم استیوگلوکونات بوده است، اما درمورد لیشمانیای برزیلی اینگونه نبوده است [۱۰]. استفاده از کتوکونازول خوراکی به میزان ۲۰۰ تا ٤۰۰ میلی گرم ۲ بار در روز به مدت ۳ ماه نتایج مناسبی داشته است و پس از یک سال هیچ گونه عود بیماری صورت نگرفته است. کتوکونازول بر روی لیشمانیوز احشایی موثر بوده است ولی بر روی لیشمانیوز جلدی ناشی از *لیشمانیا ماژور* نتایج خوبی نشان نداده است [۱۹]. ایتراکونازول ساختمانی مشابه کتوکونازول دارد و برای درمان لیشمانیوز جلدی ناشی از *لیشمانیا ترویپکا* با دوز ۱۰۰ میلی گرم روزانه به مدت ۲ ماه اثرات مناسبی داشته و فاقد عوارض جانبی بوده است [۲۰]. مطالعه Dogra و همکاران در هند بر روی کالاآزار نشان داد که فلوکونازول به میزان روزانه ۶ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۰ روز ۵۰٪ بهبودی ایجاد می‌کند [۲۱]. De Macedo Silva و همکاران از آمیودارون به عنوان یک مهار کننده‌ی قوی رشد انگل *لیشمانیا آمازونسیس* نام برده‌اند که می‌تواند باعث تغییرات غیرقابل برگشت در میتوکندری، غشای آن و همچنین فعالیت آن گردد. De Macedo Silva و همکاران پروماستیگوت‌های *لیشمانیا آمازونسیس* را تحت تأثیر غلظت‌های متفاوتی از آمیودارون قرار دادند و IC50، ٤/۲۱ µM و MIC، ۱۵µM را برای پروماستیگوت‌ها بعد از ٤۸ ساعت درمان به دست آوردند. همچنین آمیودارون با IC50، ٤۶ µM و MIC، ۶µM بر فرم‌های اماستیگوت داخل سلولی بعد از ٤۸ ساعت درمان موثر بود [۲۲]. در مطالعه‌ی حاضر نتایج حاصل از تاثیر توام دو دارو بر روی پروماستیگوت‌ها نشان داد که میانگین FIC حدود ۰/۵۲ می‌باشد، در صورتی که میانگین FIC برای

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

اماستیگوت‌های اکسنیک ۰/۶ شد. از آنجا که میزان FIC کمتر از ۱ بوده است بنابراین دو دارو در هر دو مرحله دارای اثرات سینرژیستی می‌باشند. همچنین در نمودارهای ۱ و ۲ نیز که منحنی ایزوبولوگرام هر دو مرحله را نشان می‌دهند با توجه به اینکه منحنی ایزوبول به صورت مقعر و زیر منحنی پیشگو می‌باشد، سینرژیست بودن اثر دو دارو تایید می‌گردد. در این مطالعه برای اولین بار اثرات سینرژیسم این دو دارو بر ضد *لیشمانیا اینفانتوم* نشان داده شد. این نتیجه مشابه نتایج Veiga Santos و همکاران در بکاربردن همزمان پساکونازول و آمیوداروون بر *تریپانوزوما کروزی* و نتایج Serrano Martin و همکاران در استفاده توام دو داروی آمیوداروون و میلتفوسین در ماکروفاژهای آلوده و پروماستیگوت‌های *لیشمانیا مکزیکانا* است [۲۳، ۹].

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می دهد که دو داروی آمیوداروون و کتوکونازول به تنهایی و به صورت ترکیبی در شرایط برون‌تنی بر انگل *لیشمانا اینفانتوم* موثر می‌باشند. با ترکیب دو داروی آمیوداروون و کتوکونازول و کاسته شدن دوز آنها ممکن است از اثرات جانبی داروها خصوصا داروی آمیوداروون (نظیر برادیکاردی و اختلالات هدایتی قلب، اختلال در بینایی، اسپاسم برونش و آپنه) کاسته شود. لازم به ذکر است که نتایج این مطالعه مربوط به شرایط برون‌تنی بوده و اثرات این دو دارو در شرایط درون‌تنی، اثرات جانبی آنها و تداخلات احتمالی دو دارو در مطالعات آینده مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را درقالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان تحصیلات تکمیلی (پایان نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند اعلام میدارند.

References

1- Markell E, John D, Krotoski W. Medical Parasitology, 9thed, Canada: Elesevier, 2006: 134-139.
2- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan; 19 (1): 111-126.
3- Mohebali M. Visceral leishmaniasis in Iran: review of the epidemiological and clinical features. Iranian J Parasitol. 2013 July-Sep; 8(3): 348-358.
4- Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol. 2005 May; 129(3-4): 243–251.
5- Mohebali M, Edrissian GH , Shirzadi MR , Akhoundi B , Hajjaran H , Zarei Z, et al. An observational study on the current distribution of visceral leishmaniasis in different geographical zones of Iran and implication to health policy. Travel Med Infect Dis. 2011 Mar; 9(2): 67-74.
6- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, a treatment, a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis. 2002 Aug; 2(8): 494-501.
7- Hewaldt BL. Leishmaniasis. In: Kasper, DL, Fanic, AS, Longo DL, et al, (editors). Harrison's, Principles of Internal Medicine,16th , NewYork: MC Graw-Hill, 2005: 1213-1218.
8- Murry HW, Berman JD, Davis CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005 Oct-Nov; 366(9496): 1561-77

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]

9- Serrano-Mart´ın X, Garc´ıa-Marchan Y, Fernandez A, Rodriguez N, Rojas H, Visbal G, et al. Amiodarone destabilizes intracellular Ca^{2+} homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Apr; 53(4): 1403–1410.

10- Navin TR. Placebo-controlled trial of sodium stibogluconate (pentostam) versus Ketoconazole in Guatemala. J Infect Dis. 1992 Mar; 165(3):528-534.

11- Bahrami S, Hatam GH, Razavi M, Nazifi S. In vivo cultivation of axenic amastigotes and the comparison of antioxidant enzymes at different stages of *Leishmani*a *tropica*. Trop Biomed. 2011 Aug; 28(2): 411-417.

12- Hallander HO, Dornbusch K, Gezelius L, Jacobson K, Karlsson I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. Antimicrob Agents Chemother.1982 Nov; 22:743–752.

13- Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. J Infect Dis. 1978 Feb; 137(2):122-130.

14- Jha TK. Drug unresponsiveness and combination therapy for kala-azar. Indian J Med Res. 2006 Mar; 123(3): 389-98.

15- 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 Med. 2006 May; 3(5):e162.

16- Khadem Erfan MB, Mohebali M, Kazemi-Rad E, Hajjarian H, Edrissian GH, Mamishi S, et al. Downregulation of calcineurin gene is associated with Glucantime® resiatance in *Leishmania infantum*. Iranian J Parasitol. 2013 July –Sep; 8(3): 359-366.

17- Kazemi-Rad E, Mohebali M, Khadem-Erfan MB, Saffari M, Raoofian R, Hajjaran H, et al. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. Exp Parasitol. 2013 Oct; 135(2): 344–349.

18- Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last 10 Years. Clin Infect Dis. 1997 Apr; 24 (4): 684-703.

19- Norton SA, Franken Burg S, Klaus SN. Cutaneous leishmaniasis acquired during military service in the Middle East. Arch Dermatol. 1992 Jan; 128(1): 83-7.

20- Kirigi G. The efficacy and safety of ketoconazole in visceral lishmaniasis. East Afr Med J. 1994 Jun; 71(6): 392-395.

21- Dogra J, Aneja N, Lai BB, Mishra SN. Cutaneous leishmaniasis in India: clinical experience with itraconazole (R 51211 janssen). Int J Dermatol. 1990 Nov; 29(9): 661-662.

22- De Macedo-Silva ST, Olivira Silva TLA, Urbina JA, Souza W, Fernandes Rodrigues JC. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Mol Biol Int. 2011 March; 1(1): 1-12.

23- Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JFC, de Barros Moreira TL, de Carvalho TMU, Urbina JA, et al. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents. 2012 Jul; 40(1): 61-71.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-24]