مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 41-عدد 2 (2025): 129- 142

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 41 No.2 (2025): 129 -142

عزل وتنميط سلالات محلية من طفيلي اللشمانيا المسببة للداء الجلدي وتقييم حساسيتها تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية

مؤيد يزبك مرعي*[1] شادي الياس سكرية[2] محمود الأخضر قويدر[3]

1 طالب دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، جامعة دمشق
meriee1.mouayad@damascusuniversity.edu.sy
2 أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية، جامعة دمشق، علم الجنين الجزيئي
chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy
3 أستاذ في قسم علم الحياة الحيوانية، جامعة دمشق، علم المناعة _
mahmoud.kweider@damascusuniversity.edu.sy

الملخص:

يُعد داء اللشمانيات الجلدي Cutaneous leishmaniasis (CL) أحد أهم الأمراض المستوطنة في الجمهورية العربية السورية، يسببه طفيلي وحيد خلية من جنس اللشمانيا *Leishmania* ينتقل إلى الانسان عن طريق لدغة أنثى ذبابة الرمل.

تُستخدم مركبات الأنتيموان الخماسية pentavalent antimony Sb(V) كخط أول في علاج هذا الداء منذ أكثر من سبعين عاماً، وسجل مؤخراً حدوث العديد من حالات الفشل العلاجي والانتكاسات السريرية مما يشير إلى ظهور وانتشار عزلات مقاومة لهذا الصنف الدوائي، وبالتالي أضحت الحاجة ملحة لتوصيف العزلات المحلية المسببة لداء اللشمانيات الجلدي من حيث النوع ودرجة المقاومة لمركبات الأنتيموان الخماسية. وبناءً على ما سبق هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتنميط طفيليات اللشمانيا من مرضى مصابين بداء اللشمانيات الجلدي وتقييم حساسيتها تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية بشكليها الدوائيين الغلوكانتيم والبنتوستام.

تم في هذه الدراسة عزل واستنبات أربع عزلات من اللشمانيا (L1 – L4) وتنميطها على المستوى الجزيئي بوساطة تقانة PCR-RFLP-ITS1 ومن ثّم تحديد التركيز المثبط للنصف IC_{50} لكل عزلة تجاه كل من الغلوكانتيم والبنتوستام بعد 24 ساعة من المعالجة وذلك باستخدام مقايسة (MTT) .

بينت نتائج التنميط الجزيئي أن جميع العزلات تعود للنوع *L. tropica*، وأظهرت قيم IC_{50} لكل عزلة وجود اختلافات في درجة الحساسية الدوائية بين العزلات الأربع تجاه كل من الغلوكانتيم والبنتوستام، كما أبدت العزلات الأربعة الترتيب نفسه من حيث درجة المقاومة لكلا المركبين الدوائيين، إذ كانت العزلة الأكثر مقاومة للغلوكانتيم هي نفسها الأكثر مقاومة للبنتوستام، وكذلك الامر كانت العزلة الأقل مقاومة للغلوكانتيم هي ذاتها الاقل مقاومة للبنتوستام. وأظهر مركب البنتوستام فعّالية تثبيطية أعلى من مركب الغلوكانتيم على جميع العزلات.

خلصت نتائج دراستنا إلى وجود تباين واضح بين السلالات المحلية العائدة للنوع *L. tropica* من حيث صفة المقاومة تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية على اختلاف أشكالها الدوائية.

الكلمات المفتاحية: داء اللشمانيات الجلدي، اللشمانيا المدارية، مركبات الأنتيموان الخماسية، بنتوستام، غلوكانتيم.

تاريخ الإيداع: 2023/11/26
تاريخ الموافقة: 2024/01/04

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

Isolation, Typing and Susceptibility Evaluation of Local Isolates of *Leishmania* Parasite Causes Cutaneous Leishmaniasis Against Pentavalent Antimonials

Mouayad Yzbek Meriee[1*] Chadi Elias Soukkarieh,[2] Mahmoud Al-Akhdar Kweider[3]

(1) phD Student, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria meriee1. mouayad@damascusuniversity.edu.sy
(2) Assistant Professor, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria, chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy
(3) Professor, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria, mahmoud.kweider@damascusuniversity.edu.sy

Abstract:

Cutaneous leishmaniasis (CL) is one of the most important endemic diseases in Syrian Arab Republic, (CL) is caused by a protozoan parasite of the genus *Leishmania* which is transmitted to human through the bite of sand fly female. The pentavalent antimony Sb(V) is the first-line treatment for more than 70 years. Recently, several cases of therapeutic failures and clinical relapses have been reported, and these cases indicate the emergence and spread of SbV-resistant strains, Therefore, it becomes necessary to characterize the local *Leishmania* strains depending on the species and the degree of response to antimonials. Based on previous facts, this study aimed to identify *Leishmania* strains isolated from CL patients and evaluate susceptibility of these clinical isolates towards each of glucantime and pentostam. This study was conducted with four cultures of *Leishmania* (L1 – L4) from patients with cutaneous ulcer, these isolates have been typed using the PCR-RFLP-ITS1 analysis, and the Half-maximal inhibitory concentration (IC50) was determined for each compound by conducting MTT viability assay for all isolates after treatment for 24 hours. The results of molecular typing showed that all isolates were *L. tropica* , and the values of IC50 revealed the different degrees of drug susceptibility towards each of glucantime and pentostam for all isolates, and each one of the four isolates had the same ranking towards each of the two drug compounds, The results also represented that the inhibitory rate of parasites treated with pentostam compared with glucantime was found to be significantly higher. In fact, based on our findings, There is a clear differences between local isolates of *L. tropica* species in terms of susceptibility against all forms of pentavalent antimony compounds.

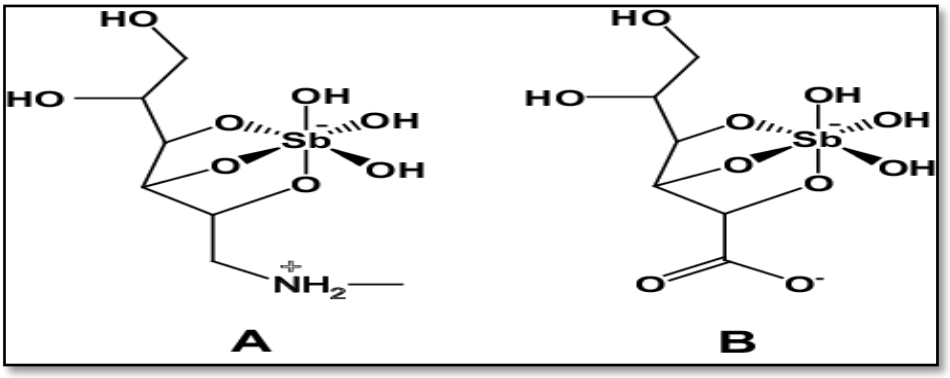
Received :2023/11/26
Accepted:2024/01/04

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Key words: Cutaneous leishmaniasis, *L. tropica*, pentavalent antimony, pentostam, glucantime.

1. المقدمة:

يعد داء اللشمانيات واحداً من أهم الأمراض الطفيلية انتشاراً حول العالم حيث يَتَوَطن في أقاليم عدة، تمتد من وسط آسيا عبر الشرق الأوسط، وجنوب أوروبا، وافريقيا إلى أمريكا اللاتينية، حيث تشير تقديرات منظمة الصحة العالمية (WHO) الى حدوث مليون إصابة جديدة سنوياً (WHO, 2023). يسبب داء اللشمانيات طفيلي وحيد خلية من جنس اللشمانيا *Leishmania*، تنقله إلى الإنسان أنثى ذبابة الرمل Sand fly الحاملة للطفيلي (Sasidharan_& Saudagar, 2021)، ويتعاقب على دورة حياة طفيلي اللشمانيا شكلين إعاشيين رئيسيين هما الشكل أمامي السوط Promastigote، الذي يأخذ شكلاً متطاولاً مغزلياً ينبثق منه السوط، ويعيش هذا النمط داخل المضيف اللافقاري الناقل وفي أوساط الاستنبات عند درجة حرارة 26 مئوية، أما الشكل عديم السوط Amastigote، يأخذ شكلاً دائرياً أو بيضوياً لا ينبثق منه السوط ويبقى ضمن حدود الخلية، ويعيش ضمن البالعات الكبيرة للمضيف الفقاري أو في أوساط الاستنبات عند درجة حرارة 37 مئوية (Naderer & McConville, 2008; Rubin-Bejerano *et al.*, 2003). تصيب العديد من أنواع طفيلي اللشمانيا البشر، وتتنوع التظاهرات السريرية لداء اللشمانيات بشكلٍ كبير، وتتراوح بين ظهور آفات جلدية قابلة للشفاء الذاتي وصولاً إلى التظاهرات المهددة للحياة life-threatening (Akhoundi *et al.*, 2017)، إذ يُعرف لداء اللشمانيات ثلاثة أشكال سريرية تختلف عن بعضها البعض من حيث نوع الطفيلي المسبب ونوع النسيج المستهدف والأعراض المرضية، حيث يعد داء اللشمانيات الجلدي cutaneous *leishmaniasis* أكثرها انتشاراً وتوطناً في الشرق الأوسط وخصوصاً الجمهورية العربية السورية، ويسببه في أغلب الحالات النوعان *L. major* و *L. tropica* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). تعتمد السيطرة على داء اللشمانيات على العلاج الكيميائي بشكل أساسي، وذلك في غياب اللقاح المناسب (Brandonisio & Spinelli, 2002)، حيث بقيت الأدوية المستعملة في علاج الداء محدودة جداً بالمقارنة مع الانتشار الواسع للداء حول العالم، واقتصرت على زمر دوائية قليلة أهمها مركبات الأنتيموان خماسية التكافؤ pentavalent antimonials التي تم تطبيقها سريرياً منذ عام 1940م كخط أول في علاج داء اللشمانيات، بشكليها الدوائيين: الغلوكانتيم ®Glucantime (meglumine antimoniate) والبنتوستام ®Pentostam (sodium stibogluconate) حيث يظهر الشكل (1) التركيب الكيميائي المقترح لكليهما (Frezard *et al.*, 2013).



الشكل (1). البنية الكيميائية لمركبات الأنتيموان الخماسية. (A). **غلوكانتيم.** (B). **بنتوستام. (Frézard *et al.*, 2008)**

لا تزال آلية عمل مركبات الأنتيموان الخماسية تجاه طفيلي اللشمانيا غير واضحة بدقة وهناك عدة فرضيات لطبيعة الشكل النهائي الفعّال لهذه المركبات ولآلية عملها في قتل الطفيلي (Frezard *et al.*, 2013). فمثلاً تقترح إحدى الفرضيات اختزال الشكل الخماسي للانتيموان Sb(V) داخل المضيف الفقاري وداخل الطفيلي إلى الشكل الثلاثي Sb(III) الذي يعد الشكل الأكثر سمية للطفيلي (Shaked-Mishan *et al.*, 2001) وتسمى هذه الفرضية بنموذج طليعة الدواء Prodrug model، إذ يتم قبط الشكل الخماسي إلى داخل طفيلي اللشمانيا بشكل رئيس من خلال نمط خاص من القنوات التابعة إلى عائلة الأكوابورينات aquaporin family التي تسمح بعبور مواد منحلة solutes إضافة إلى الماء aquaglyceroporin (AQP1) (Gourbal *et al.*, 2004). بعد عبور Sb(V)

للغشاء الخلوي تقوم أربع أنواع من الثيولات Thiol، منها الموجود داخل خلايا المضيف (خلايا الثدييات) وهي الغلوتاثيون (GSH) الموجود داخل العصارة الخلوية، والسيستئين (Cys) والسيستئين_غلايسين(Cys-Gly) الموجودة داخل ليزوزومات (Gainey *et al.*, 1996)، ومنها الموجود داخل خلايا الطفيلي كالتريبانوثيون (T(SH)2) (Fairlamb & Cerami, 1992) باختزال هذا الشكل الخماسي إلى الشكل (Sb(III وذلك بمشاركة أنزيمين خاصين بالطفيلي هما (TDR1) thiol-dependent reductase (Denton *et al.*, 2004) و(ACR2) antimoniate reductase (Zhou *et al.*, 2004)، لتتشكل نتيجة ذلك معقدات مستقرة من الثيولات المرتبطة بالشكل الثلاثي Thiol-Sb(III) يتم عزلها داخل فجوة أو إخراجها عن طريق نواقل من عائلة ATP-binding cassette (ABC) وبشكل خاص من قبل multidrug resistance protein A (MRPA) (Légaré *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 1996). ينتج عن تشكيل هكذا معقدات انخفاض تركيز الثيولات داخل طفيلي اللشمانيا مما يؤدي إلى زيادة حساسية الطفيلي للإجهاد التأكسدي (Wyllie *et al.*, 2004)، وتزداد هذه الحساسية مع ارتباط (Sb(III بالموقع الفعّال لأنزيم اختزال التريبانوثيون TR مما يؤدي إلى تثبيطه وإلى زيادة إنتاج Reactive Oxygen Species (ROS) داخل الطفيلي (Frezard *et al.*, 2013) فتصبح الطفيليات حساسة للغاية تجاه الإجهاد التأكسدي (Beig *et al.*, 2015). كما يمكن للشكل (Sb(III أن يحل مكان (Zn(II في بنية أحد أنماط عوامل الانتساخ المعروفة بإصبع الزنك zinc-finger مما يؤدي إلى عدم استقرار في بنية هذه العوامل وإلى خلل في وظائفها المتعددة، وينتج عن ذلك تغير في التعبير الجيني لعدد من الجينات الهامة التي تضبط هذه العوامل انتساخها مثل عائلة الكاسبازات (Caspases) مما يؤدي إلى تحريض عملية استموات (apoptosis) الطفيلي (Bhandari *et al.*, 2011; Frézard *et al.*, 2009; Laity *et al.*, 2001; Leon & Roth, 2000)

بينما تقترح فرضية أخرى دوراً جوهرياً للأنتيموان الخماسي (Sb(V كشكل نهائي فعّال وتسمى هذه الفرضية بنموذج الانتيموان خماسي التكافؤ الفعال Active Sb(V) model، يضاف إلى الدور الذي يمكن أن يؤديه الشكل الثلاثي الفعّال (Sb(III، ضد اللشمانيا من خلال تكوينه لمعقدات مع النكليوزيدات الريبية أحجار البناء الرئيسة للأحماض النووية Sb(V)-ribonucleoside وخصوصاً مع البيورينات SbV-purine إذ تعد هذه المعقدات شديدة السمية تجاه طفيلي اللشمانيا (Demicheli *et al.*, 2002; Demicheli *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010) نظراً لاستنزافها للبيورينات وتثبيط ناقلاتها بالإضافة إلى تثبيط أنزيم التوبوإيزوميراز من النمط الأول DNA topoisomerase type1 كأحد الأنزيمات الهامة في حادثة تضاعف DNA الطفيلي (Frézard et al., 2009; Lucumi et al., 1998; Walker & Saravia, 2004). ومنذ عدة سنوات، تتالت التقارير عن مقاومة كبيرة تبديها الأنواع المختلفة من طفيليات اللشمانيا تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية (Ashutosh *et al.*, 2007)، إذ أشارت العديد من التقارير إلى عدم استجابة الطفيلي للعلاج باستعمال هذه المركبات، أو إلى حدوث نكس سريع للمرضى المصابين حديثاً بعد بدء علاجهم بمركبات الأنتيموان، ويعزى ذلك إلى تطوير طفيلي اللشمانيا مقاومة تجاه هذه الأدوية (Sundar *et al.*, 2000). وصنفت الدراسة مقاومة طفيليات اللشمانيا لدواء معين إلى "طبيعية" أي إصابة المريض بسلالة مقاومة للعلاج أو مكتسبة، تظهر بعد تعرض طفيليات اللشمانيا لجرعات دوائية دون المستوى الأمثل للعلاج أو خلال فترة زمنية أقل مما تتطلبه الدورة العلاجية (Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

يؤدي التنوع الجيني للطفيليات والاختلافات الوراثية بين سلالات النوع الواحد إلى وجود أنماط ظاهرية متعددة ترتبط بمظاهر سريرية متنوعة ودرجات مختلفة من الحساسية الدوائية ولقد بينت العديد من الدراسات وجود ارتباط بين الأنماط الجينية المتغايرة واختلاف المظاهر السريرية في سلالات النوع الواحد (Chargui *et al.*, 2009; Hide *et al.*, 2013).

أهمية البحث وأهدافه:

لوحظ في السنوات الأخيرة انتشار واسع لداء اللشمانيات الجلدي في جميع المحافظات السورية، حيث يعتقد حالياً وجود تغير في وبائية داء اللشمانيات في الجمهورية العربية السورية، وظهور اختلافات في النمط الظاهري بين سلالات النوع الواحد، لا سيما درجة الحساسية الدوائية إذ تسجل المعلومات الواردة من مراكز الرعاية الصحية في دمشق وجود زيادة في عدد الحالات غير النمطية إضافة إلى حدوث العديد من حالات الفشل العلاجي عند تطبيق أدوية الأنتيموان الخماسية. وعليه أصبح من المهم إجراء تقييم

مبدئي لمدى نجاعة البروتوكولات العلاجية المستخدمة حالياً في تدبير هذا الداء خصوصاً في ظل ندرة الدراسات حول المقاومة العلاجية لهذا الطفيلي في الجمهورية العربية السورية، ولذلك هدف هذا البحث إلى الحصول على عدد من عزلات طفيلي اللشمانيا المسبب للداء الجلدي في الجمهورية العربية السورية، وتحديد درجة الحساسية الدوائية لهذه العزلات تجاه الشكلين الدوائيين الأكثر استعمالاً من مركبات الأنتيموان الخماسية، وهما الغلوكانتيم والبنتوستام.

2. مواد البحث وطرائقه:

تمّ إجراء هذا البحث في مختبر البحوث (1) بقسم علم الحياة الحيوانية في كلية العلوم بجامعة دمشق، على النحو التالي:

1.2. جمع العينات:

عزلت الطفيليات من الآفة مباشرة لمرضى مشخصين بداء اللشمانيات الجلدي ومراجعين لمركز العيادات الشاملة في منطقة الزاهرة بدمشق بعد تأكيد الإصابة من خلال الفحص المجهري المباشر لـ لطاخة مأخوذة من مكان الإصابة وملونة بملون غيمزا.

2.2. استنبات الطفيلي:

تم استنبات الطفيليات المعزولة من الآفات الجلدية مباشرة على وسط N.N.N، والمضاف له الصادين الحيويين (ستربتومايسين Streptomycin وبنسلين Penicillin) بتركيز 100 وحدة / مل، وحضنت المستنبتات عند درجة حرارة 26 مئوية مع المراقبة اليومية بالمجهر المقلوب للتأكد من نمو الأشكال أمامية السوط Promastigote، ثم نقلت الطفيليات المستنبتة بتركيز بدئي 2×10^6 إلى 5 ميلي من وسط زرع سائل RPMI-1640 (Sigma) مدعم بـ 10% من مصل البقر الجنيني fetal bovine serum (Sigma) FBS منزوع المتممة بالتسخين، و 0.5 ميلي مول من الغلوتامين L-glutamine (Sigma) حيث تم إجراء تقييم يومي للمستنبتات الطفيلية من حيث العدد والشكل والنشاط بدءاً من طور الكمون مروراً بالطور اللوغاريتمي حتى الوصول إلى طور الاستتباب حيث يكون تركيز الطفيلي في الوسط أعظمياً تمهيداً لاستخدامه في المراحل اللاحقة.

3.2.استخلاص DNA:

تم تثفيل 3 ميلي لتر من وسط الزرع السائل الحاوي على 19×10^6 طفيلي/ ميلي لتر بسرعة 3000 rpm عند درجة حرارة 4 مئوية ولمدة 8 دقائق، ثم أزيل السائل الطافي وغسل الراسب بدارئة ملحية فوسفاتية Phosphate buffered saline (PBS) ثم تم استخلاص DNA باستخدام طقم لاستخلاص DNA الجينومي وتنقيته (Wizard genomic DNA purification Kit;Promega)، حيث تم إتباع الخطوات المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة. تم حساب تركيز DNA بوساطة مقياس المطيافية الضوئية Genova، وحفظ عند الدرجة 20− مئوية.

4.2. التنميط الجزيئي للطفيلي اللشمانيا بوساطة تقانة PCR-RFLP:

أجري تفاعل PCR باستعمال أنزيم Taq polymerase ضمن طقم (master mix 2X, GeneDirex) على DNA المستفرد من العزلات المزروعة بالإضافة إلى DNA المستفرد من سلالة مرجعية من اللشمانيا المدارية *L.tropica* (MHOM/SY/90/LEM2066) باستخدام شفع من المرئسات (LITSR / L5.8S) الخاصة بتضخيم المنطقة Internal Transcribed Spacer-1 (ITS1) من جينوم اللشمانيا، حيث يفصل هذا التسلسل المحافظ من النيكليوتيدات بين جينات rRNA المرمزة للوحدتين 18S و5.8S ويعتمد عليه في التنميط الجزيئي للتمييز بين أنواع اللشمانيا المنتشرة في العالم القديم (El Tai *et al*., 2000; Van der Auwera & Dujardin, 2015).

الجدول (1). التسلسلات النيكليوتيدية للمرئسات النوعية المستخدمة في تفاعل PCR

المرئسة	التسلسل النيكليوتيدي	حجم ناتج PCR (bp)
LITSR	5′ -CTGGATCATTTTCCGATG-3′	330
L5.8S	5′ -TGATACCACTTATCGCACTT-3′	

حيث أجري تفاعل PCR ضمن الشروط الآتية: 5 دقائق في 95 مْ ، 35 دورة (30 ثانية في 94 مْ، 30 ثانية في 56 مْ ، 60 ثانية في 72 مْ) و 6 دقائق في 72 مْ. هضم بعدها 10µl من كل ناتج تفاعل PCR بوساطة 0.5µl من أنزيم التقييد HaeIII بتركيز 10 وحدة / ميكرولتر والذي يقطع ضمن التسلسل GG/CC حيث تم الحضن عند درجة الحرارة 37 مْ لمدة 3 ساعات (Van der Auwera & Dujardin, 2015)، تم التأكد من نواتج تفاعل PCR وناتج عملية الهضم بأنزيم التقييد بتقنية الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة الأغاروز بتركيز % 1.5 في دارئة رحلان من TBE وصبت الهلامة في قوالب خاصة بجهاز الرحلان (PeQlab) وأضيف الإتيديوم بروماید بتركيز نهائي قدره 0.5 µg/ml. مزجت العينات مع 2 µl من دارئة التحميل 6X Loading Buffer ضمن حجم نهائي قدره 12 µl. رحلت العينات وواسمات الأطوال المعيارية(GeneDirex) DNA Ladder 50bp بتطبيق تيار كهربائي قدره 100 فولت مدة 30 دقيقة. وكشفت عصائب DNA باستخدام منبع أشعة فوق بنفسجية قصيرة الموجة (Cleaver)، ووثقت الهلامة باستخدام جهاز موثق الهلام Gel Documentation مزود بآلة تصوير رقمية ذات مرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية.

5.2. حساب نسب التثبيط المئوية لطفيلي اللشمانيا باستخدام مقايسة MTT وتحديد قيم التراكيز المثبطة للنصف IC50:

مقايسة (MTT) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide هو اختبار قياس لوني colorimetric لتقييم نشاط الخلايا الاستقلابي وعيوشيتها، تقوم فيه إنزيمات الأكسدة والاختزال في الخلايا الحية بإرجاع أملاح التيترازوليوم Tetrazolium الصفراء إلى مركب الفورمازان formazan ذو اللون البنفسجي، حيث تتناسب شدة اللون الناتج طرداً مع نسبة عيوشية الخلايا (Stockert *et al.*, 2018)، تم قياس عيوشية طفيليات اللشمانيا أمامية السوط في الزجاج، بعد معالجتها بسلسلة من التراكيز المتدرجة التي تمت أمثلتها لكل مركب على حدة، باستخدام صفائح 96 بئر وحجم نهائي من وسط الزرع قدره 100µl يحوي تركيز معين من المادة الدوائية بالإضافة إلى عدد ثابت 8×10^5 من طفيليات اللشمانيا في كل بئر، حيث تم الحضن لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 26 مْ، بواقع مكررين لكل تركيز كما يوضح الجدول الآتي:

الجدول (2). التراكيز المستخدمة من مركب الأنتيموان الخماسي في كل من دوائي الغلوكانتيم والبنتوستام

الغلوكانتيم	الشاهد	18.75 µg/µl	37.5 µg/µl	75 µg/µl	150 µg/µl
البنتوستام	الشاهد	2.5 µg/µl	10 µg/µl	20 µg/µl	40 µg/µl

بعد انتهاء الحضن أضيف لكل بئر 10 µl من محلول (MTT) وتم الحضن لمدة 3 ساعات عند درجة حرارة 26 مْ، ثم قمنا بحل بلورات الفورمازان المتشكلة بإضافة 100 µl من مادة (DMSO) لكل بئر مع الرج لمدة 10 دقائق، وقيست امتصاصية الآبار على جهاز مطياف ضوئي قارئ صفائح (Humareader®) عند طول موجة 540 nm، ثم تم حساب النسبة المئوية للتثبيط عند كل تركيز من خلال المعادلة التالية:

$$\text{نسبة التثبيط \%} = \frac{\text{امتصاصية الشاهد} - \text{امتصاصية العينة}}{\text{امتصاصية الشاهد}} \times 100$$

بالاعتماد على نسب التثبيط المئوية الناتجة تم حساب قيم IC50 لكل مركب دوائي على كل عزلة من عزلات الطفيلي الأربع.

6.2. الدراسة الإحصائية:

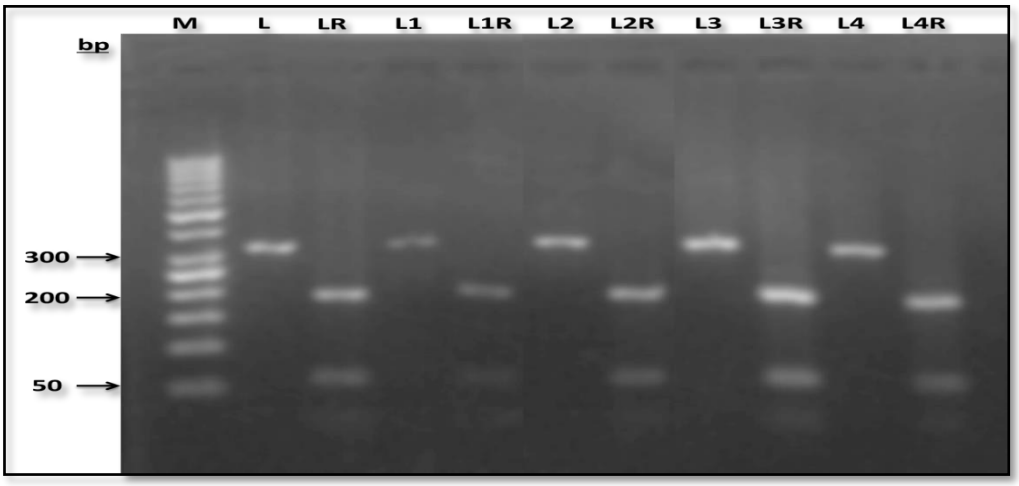
تم إجراء الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج GraphPad Prism الإصدار (9.5.1) حيث تمت دراسة تأثير المتغير المستقل (تركيز المركب الدوائي) على المتغير التابع (نسبة التثبيط المئوية) في كل عزلة وعلاقة الارتباط بينهما وفق معامل بيرسون Pearson's R ومقارنة الاختلافات بين العزلات وفق اختبار تحليل التباين (ANOVA) واختبار توكي متعدد المقارنات Tukey'smultiple comparisons test. كررت جميع التجارب ثلاث مرات (n=3)، تم حساب قيم IC50 من خلال رسم المنحني المناسب وفق نمط

الانحدار غير الخطي بتطبيق المعادلة الناتجة عن العلاقة log(inhibitor) vs. Normalized response - Variable slope وتم التعبير عن النتائج باحتساب المتوسط ± الانحراف المعياري mean±SD، واعتبرت الاختلافات معتد بها احصائياً عند $P<0.05$.

3. النتائج:

1.3. التنميط الجزيئي للطفيلي بوساطة PCR-RFLP :

نتج عن تفاعلات PCR المطبقة على DNA تركيزه 75 ng/µl مستفرد من العزلات الأربعة والعزلة المرجعية *L. tropica* باستخدام المرئستين (LITSR/L5.8S) عصابة واحدة طولها تقريباً 330 bp، وأظهرت عملية الهضم الكامل لناتج PCR في كل العزلات المدروسة باستخدام أنزيم التقييد HaeIII تماثل في طول وعدد الشدف الناتجة (200bp و60bp) بين العزلات الأربع وبشكل يتطابق مع السلالة المرجعية (MHOM/SY/90/LEM2066) ويتوافق مع المرجعيات مما يؤكد أن جميع العزلات التي تم عزلها من المرضى (L1 – L4) تعود للنوع *L. tropica* كما يظهر في ناتج الرحلان على هلامة من الأغاروز 1.5% الشكل (2).



الشكل (2). صورة رحلان كهربائي على هلامة من الأغاروز بتركيز 1.5% لناتج تفاعل PCR-RFLP باستخدام المرئستين (LITSR/L5.8S) وأنزيم التقييد HaeIII على السلالة المرجعية L والعزلات الأربع التي عزلت من المرضى (L1-L4). تشير الرموز L, L1, L2, L3, L4 إلى نواتج تفاعل PCR دون هضم (عصابة واحدة بطول 330 bp) للسلالة المرجعية وللعزلات الأربع، بينما تشير الرموز LR, L1R, L2R, L3R, L4R إلى نواتج الهضم الكامل لتفاعل PCR (عصابتان بطول 200bp و60bp)، ويمثل M الواسم المعياري 50bp.

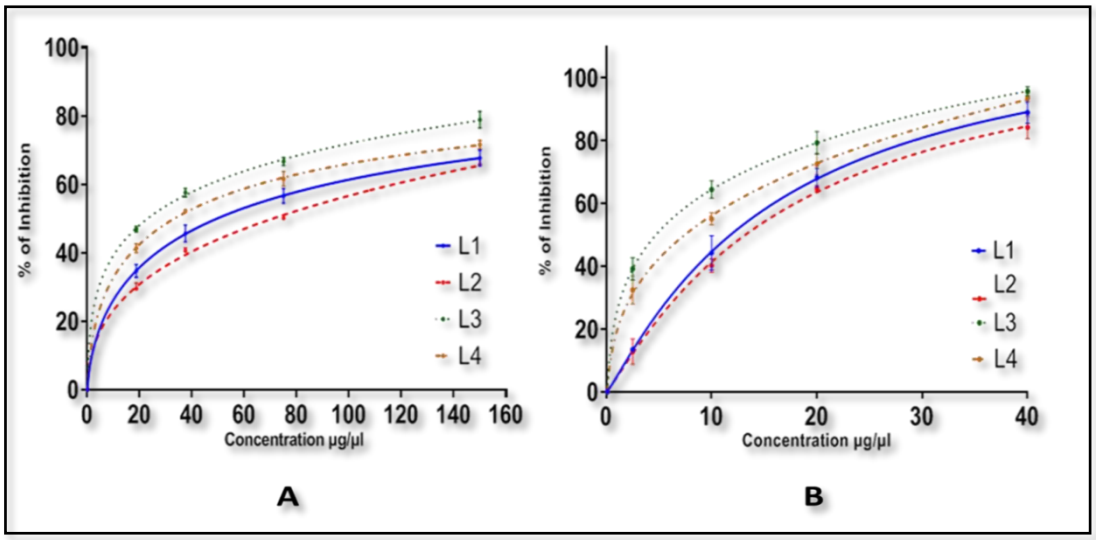
2.3. حساب نسبة تثبيط الطفيليات بمقايسة MTT:

بالاعتماد على قيم الامتصاصية اللونية لمركب الفورمازان المنحل عند 24 ساعة من معالجة الأشكال أمامية السوط للطفيليات المستنبتة بالمركبات الدوائية، تم حساب نسبة التثبيط المئوية للعزلات الطفيلية الأربع تجاه تدرج تراكيز كل من مركب الغلوكانتيم ومركب البنتوستام كما يوضح الجدول (3).

الجدول (3). نسب التثبيط المئوية الناتجة عن معالجة طفيليات العزلات الأربع (L1-L4) بالمركبين الدوائيين غلوكانتيم وبنتوستام

نسبة التثبيط %								
بنتوستام				غلوكانتيم				
2.5 µg/µl	10 µg/µl	20 µg/µl	40 µg/µl	18.75 µg/µl	37.5 µg/µl	75 µg/µl	150 µg/µl	
13.437±0.685	44.220±5.450	68.230±2.929	88.990±3.470	34.697±1.868	45.630±2.449	56.580±2.139	67.700±2.298	L1
12.800±4.025	40.197±2.189	64.663±1.036	84.247±3.556	29.483±1.656	40.590±0.796	50.123±0.900	65.733±2.052	L2
39.173±3.563	64.413±2.755	79.317±3.555	95.767±1.486	46.900±0.774	57.577±1.235	66.683±1.156	78.853±2.425	L3
32.417±4.407	55.043±1.944	72.520±3.340	93.567±1.511	41.343±1.287	52.250±0.401	61.557±2.155	71.593±1.219	L4

عند دراسة علاقة الارتباط بين التراكيز المستعملة للمركبين الدوائيين ونسبة التثبيط المئوية لهذه التراكيز تبين وجود علاقة ارتباط إيجابية بين تدرج تراكيز كل من مركبي الغلوكانتيم والبنتوستام من جهة وزيادة نسب التثبيط المئوية في العزلات الأربع من جهة أخرى، حيث كانت أقل قيمة لمعامل الارتباط بيرسون أعلى من 0.8 عند قيم معنوية $p<0.05$ كما يظهر الشكل (3).



الشكل (3). المنحنيات البيانية الناتجة عن رسم العلاقة بين نسب التثبيط المئوية وتدرج تراكيز مركب الغلوكانتيم (A) و مركب البنتوستام (B) للعزلات المحلية الأربع

يلخص الجدول (4) قيمة الجرعة المثبطة للنصف IC50 لكل عزلة مع كل مركب دوائي مرفقاً بالتحليلات الإحصائية الناتجة عند مستوى ثقة 95% باستخدام برنامج GraphPad Prism

الجدول (4). الجرعة المثبطة للنصف IC_{50} مقدرة بـ$\mu g/\mu l$ لكل عزلة من العزلات المحلية الأربع

أعطت العزلات (L1-L4) قيم IC50 حقيقية حيث وقعت ضمن مجال الثقة CI وفق معامل تحديد R^2 مرتفع

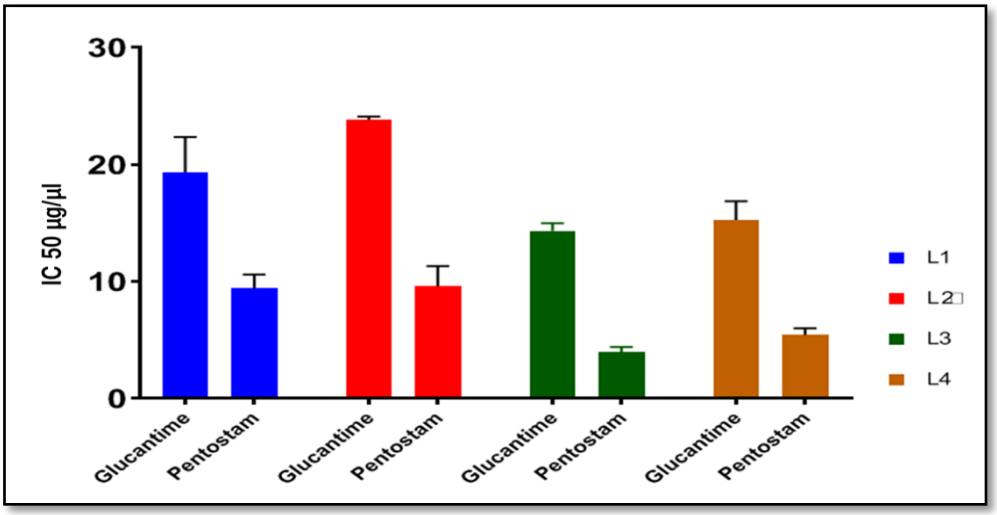
Isolates	IC50	Confidence Intervals (CI)	R^2 value	
L1	19.350±3.005	16.09 to 22.10	0.9853	غلوكانتيم
	9.422±1.195	7.930 to 10.81	0.9789	بنتوستام
L2	23.860±0.259	19.90 to 27.68	0.9779	غلوكانتيم
	9.615±1.717	8.192 to 11.20	0.9782	بنتوستام
L3	14.337±0.650	11.37 to 16.91	0.9893	غلوكانتيم
	3.978±0.450	3.170 to 4.874	0.9789	بنتوستام
L4	15.280±1.592	12.81 to 17.58	0.9914	غلوكانتيم
	5.456±0.564	4.163 to 6.945	0.9643	بنتوستام

بين التحليل الإحصائي لقيم IC50 لمركب غلوكانتيم باستعمال اختبار توكي متعدد المقارنات والذي تم بواسطته مقارنة هذه القيم التابعة لكل عزلة مع قيم العزلات الأخرى، وجود فروق معنوية بين مثنويات العزلات الآتية: (L1,L2) و(L1,L3) و(L2,L3) و(L1,L4) و(L2,L4) بينما لم تظهر العزلتين L3 وL4 أي فروق معنوية بينهما. وأظهر تحليل إحصائي مماثل لقيم IC50 لمركب بنتوستام فروقاً معنوية بين مثنويات العزلات الآتية (L1,L3) و(L1,L4) و(L2,L3) و(L2,L4)، بينما لم تظهر مثنويات العزلات الآتية: (L1,L2) و(L3,L4) أي فروق معنوية بينها وذلك عند مستوى ثقة 95% كما يظهر في الجدول (5) الذي يلخص مجمل هذه النتائج.

الجدول (5). التحليل الاحصائي باستعمال اختبار توكي متعدد المقارنات Tukey's multiple comparisons test لبيان الدلالة المعنوية عند مقارنة قيم IC_{50} بين العزلات المختلفة لكل من المركبين الدوائيين غلوكانتيم وبنتوستام

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Glucantime					
L1 vs. L2	-4.510	-7.911 to -1.109	Yes	**	0.0078
L1 vs. L3	5.013	1.612 to 8.414	Yes	**	0.0033
L1 vs. L4	4.070	0.6691 to 7.471	Yes	*	0.0165
L2 vs. L3	9.523	6.122 to 12.92	Yes	****	<0.0001
L2 vs. L4	8.580	5.179 to 11.98	Yes	****	<0.0001
L3 vs. L4	-0.9433	-4.344 to 2.458	No	ns	0.8563
Pentostam					
L1 vs. L2	-0.1930	-3.594 to 3.208	No	ns	0.9984
L1 vs. L3	5.444	2.043 to 8.845	Yes	**	0.0016
L1 vs. L4	3.966	0.5655 to 7.367	Yes	*	0.0196
L2 vs. L3	5.637	2.236 to 9.038	Yes	**	0.0011
L2 vs. L4	4.159	0.7585 to 7.560	Yes	*	0.0142
L3 vs. L4	-1.478	-4.879 to 1.923	No	ns	0.6097

بمقارنة حساسية العزلات الأربعة للمركبين الدوائيين الغلوكانتيم والبنتوستام، أظهرت العزلات نفس الترتيب بدرجة الحساسية لكلا المركبين الدوائيين حيث تدرجت من الأقل حساسية (الأعلى مقاومة) إلى الأعلى حساسية (الأقل مقاومة) وفق التسلسل التالي L3 < L4 > L1> L2، وبالعودة إلى قيم IC50 يتبين أن لمركب البنتوستام فعّالية تثبيطية أكبر من مركب الغلوكانتيم على جميع العزلات كما يظهر الشكل (4).



الشكل (4). مخطط مقارنة بين الغلوكانتيم والبنتوستام يوضح الاختلاف في الفعالية التثبيطية لكل منهما على كل عزلة من العزلات الأربعة استناداً الى قيم IC_{50}

4. المناقشة:

تُستخدم الأنتيموانات خماسية التكافؤ Sb(V) وعلى رأسها الغلوكانتيم والبنتوستام كعلاجات الخط الأول لداء اللشمانيات، وذلك إما بمفردها وإما بالمشاركة مع أدوية الخط الثاني مثل الأمفوتريسين ب، وميلتفوسين في بعض الحالات، وفي حالات أخرى بالمشاركة مع العلاج بالتبريد cryotherapy (Aronson *et al.*, 2016)، حيث تواجه الجوانب العلاجية لهذه المركبات الآن تحديات كبيرة بسبب المقاومة السريرية التي ظهرت في جميع أنحاء العالم تجاه المعالجة باستعمال هذه الأدوية، وتتجلى هذه المقاومة بكثرة الحالات غير النمطية للداء وكثرة الحالات الناكسة بعد الشفاء الظاهر (Sundar *et al.*, 2000). بينت العديد من التقارير حول العالم أن درجة حساسية العزلات المختلفة من طفيلي الليشمانيا والتابعة للنوع الواحد والتي يمكن أن تعزل من منطقة جغرافية واحدة تختلف

تجاه مركب دوائي معين، كما أنه لا يمكن تصنيف العزلات بين حساسة ومقاومة للدواء فقط بل أن درجة الحساسية أو المقاومة تختلف باختلاف العزلة، وبالتالي هناك طيف واسع من الحساسية أو المقاومة للسلالات المختلفة التابعة للنوع الواحد(Sasidharan *et al.*, 2021). تؤكد هذه المعطيات على أن اختلاف نجاعة العلاج التي سجلت وتُسجل في كثير من دول العالم بين المرضى، لا يعود فقط إلى الإختلافات الفردية للمرضى (الاستجابة المناعية والخلفية الجينية) وإنما لنمط سلالة الطفيلي المسبب للداء أيضاً (Hadighi *et al.*, 2007)، حيث ظهر التنوع في مقاومة مركبات الأنتيموان الخماسية عند مقارنة قيم IC_{50} بين العزلات المحلية التابعة لنوع *L. tropica* (بين كل عزلتين على حدة)، إذ أعطت معظم المقارنات لهذه القيم في كلا المجموعتين الدوائيتين فروقات ذات دلالة معنوية، كما أن التأثير المثبط لكل مركب دوائي على حدة كان متغايراً بشكل واضح بين العزلات المختلفة، حيث أظهرت قيم IC_{50} أن العزلة الأكثر مقاومة للدوائين هي L2 والأقل مقاومة هي L3، وكان هذا الفرق في قيم IC_{50} بين هاتين العزلتين 1.66 ضعف للغلوكانتيم و2.42 ضعف للبنتوستام. إن هذا التفاوت في درجة الحساسية للدواء بين عزلات طفيلي اللشمانيا التابعة للنوع *L. tropica* والمعزولة من مرضى غير معالجين سابقاً بمركبات الأنتيموان تعود إلى مقاومة أولية لمركبات الأنتيموان والتي تّعد صفة طبيعية خاصة بكل عزلة، والتي يمكن أن تظهر أو أن تتنوع بدرجتها نتيجة الضغط الإصطفائي الذي تتعرض له عند معالجة المصابين بمركبات الأنتيموان الخماسية وخصوصاً بجرعات دوائية منخفضة أو بدورات علاجية غير كاملة (Ponte-Sucre *et al.*, 2017) مما يجعل الفرصة متاحة أمام طفيليات اللشمانيا لتطوير مقاومة عن طريق اللجوء إلى آليات مختلفة يتضمن بعضها إجراء تعديلات على المستوى الجينومي من خلال حدوث تغيرات في تسلسل DNA لجينات مُحددة، أو مضاعفة وتكرار الجينات الضرورية لمعاوضة الأنزيمات المستهدفة مثل TDR1 وACR2 أو على مستوى التعبير الجيني وبالتالي زيادة التعبير عن البروتينات والنواقل المسؤولة عن ضخ الأنتيموان خارج الطفيلي مثل MDR1 وMRPA أو خفض التعبير الجيني عن البروتينات المسؤولة عن قبط المركب الدوائي مثل بروتين (AQP1)، بالإضافة إلى تعديلات على المستوى الاستقلابي مثل ارتفاع مستويات الثيول داخل الخلايا للحماية من الإجهاد التأكسدي (Ashutosh *et al.*, 2007; Decuypere *et al.*, 2005; Jeddi *et al.*, 2011). تشير التقارير أن المقاومة الأولية تظهر بشكل أساسي في المناطق التي تنتشر فيها أنواع طفيلي اللشمانيا ذات دورة الحياة البشرية anthroponotic التي لا تتطلب مضيف غير الإنسان، مما ينتج عنه تعريض الطفيلي لضغط دوائي لفترة زمنية أطول مقارنة مع الأنواع ذات دورة الحياة التي تشترك فيها الحيوانات zoonotic مثل القوارض (Aït-Oudhia *et al.*, 2011). حيث من المعروف أن طفيليات النوع *L. tropica* المنتشر في الجمهورية العربية السورية والمسبب الرئيس للداء الجلدي، تنتقل من إنسان إلى آخر بشكل أساسي عن طريق لدغة أنثى ذبابة الرمل دون المرور بمضيف خازن حيواني لذلك يمكن لطفيليات هذا النوع أن تطور مقاومة تجاه المركبات الدوائية الأكثر استعمالاً بسهولة أكبر من طفيليات الأنواع الأخرى (Al-Nahhas & Kaldas, 2013). لوحظ في هذه الدراسة اصطفاف العزلات الأربع المدروسة وفق التراتبية نفسها من حيث درجة الحساسية الدوائية تجاه كل من الغلوكانتيم والبنتوستام، فعندما اختبرت حساسية الأشكال أمامية السوط المستنبتة في الزجاج لهذه العزلات تجاه المركبين الدوائيين سابقي الذكر كانت طفيليات العزلة L2 الأكثر مقاومة تلتها طفيليات العزلات L1 ومن ثم L4 وأخيراً L3، تشير هذه المعطيات إلى وجود مقاومة متصالبة cross-resistant للعزلات المحلية التابعة للنوع *L. tropica* تجاه كلا المركبين الدوائيين، حيث أكدت عدة دراسات اختبرت حساسية الشكل عديم السوط amastigote لأنواع مختلفة من طفيلي اللشمانيا أن السلالات المقاومة للغلوكانتيم أبدت مقاومة متصالبة للبنتوستام (Ephros *et al.*, 1999 Hadighi *et al.*, 2007;)، على اعتبار أن كلا المركبين ينتميان الى نفس الزمرة الدوائية (أملاح الأنتيموان الخماسية) مما يشير إلى أن آليات المقاومة عند طفيلي اللشمانيا موجهة بشكل أساسي تجاه شاردة الأنتيموان (Hadighi *et al.*, 2007).

كان من المثير للاهتمام في هذه الدراسة عند المقارنة بين فعّالية مركبي الغلوكانتيم والبنتوستام من حيث الجرعة المثبطة للنصف لكل سلالة على حدة وجود فروق واضحة في الفعالية التثبيطية، وذلك عند معالجة الأشكال أمامية السوط المستنبتة في الزجاج، إذ كان البنتوستام أكثر قدرة تثبيطية على نمو هذه الأشكال من الغلوكانتيم بـ2.1 إلى 3.6 ضعف، وهو ما يتوافق مع نتائج دراسة

أجريت في تركيا لتقييم فعّالية الأدوية المستخدمة في تدبير داء اللشمانيات الجلدي على سلالات مقاومة من اللشمانيا المدارية معزولة من مرضى غير مستجيبين للعلاج بمركبات الأنتيموان الخماسية حيث كانت الفعالية السامة الخلوية (القدرة التثبيطية) لمركب البنتوستام على الأشكال أمامية السوط المستنبتة في الزجاج أعلى من مركب الغلوكانتيم (Özbilgin *et al*., 2020)، على النقيض من ذلك بينت دراسة سريرية أجريت على مرضى مصابين بداء اللشمانيات الجلدي أن تطبيق الغلوكانتيم داخل الآفة يعطي معدلات شفاء أعلى مقارنة بالبنتوستام وذلك بغض النظر عن الجنس والعمر ومكان الآفة (Yesilova *et al*., 2016). ويمكن أن يفسر سبب اختلاف النتائج بين الدراسات باختلاف تصميم التجربة الذي يمكن أن يغير بشكل كبير من النتائج (دراسة المقاومة على الطفيليات المعزولة والمستنبتة في الزجاج أو ضمن الآفة في الكائن الحي)، كما تختلف التأثيرات السمية لكل من المركبين الدوائيين باختلاف شكل الطفيلي (أمامي السوط أو عديم السوط)، ويمكن أن تعزى الاختلافات في التأثير الدوائي للمركبين إلى الاختلافات الدقيقة في طريقة تحضير غلوكانات الصوديوم (البنتوستام) وميغلومين الأنتيموان (الغلوكانتيم) لا سيما درجة بلمرتها التي قد تحدث فرقاً ملحوظاً في الفعّالية المضادة للشمانيا (Roberts *et al*., 1998)، كما أن احتواء البنتوستام على مادة كلوروكريسول chlorocresol التي تضاف عند تحضيره والتي تتصف بتأثير سام على طفيلي اللشمانيا والتي قد تؤدي دوراً تآزرياً مع غلوكانات الصوديوم ينتج عنه فعالية تثبيطية أكبر للبنتوستام مقارنة مع مركب الغلوكانتيم (Ephros *et al*., 1999; Jeddi *et al*., 2011). تشير نتائج هذه الدراسة إلى اختلاف حساسية العزلات المحلية التابعة للنوع *L. tropica* والمسببة للداء الجلدي للمركبات الدوائية الأكثر استعمالاً في العلاج وهي مركبات الأنتيموان الخماسية مما يشير إلى ضرورة تعديل الاستراتيجيات العلاجية بما فيها فترة العلاج وكمية الجرعة الدوائية بما يتناسب مع كل حالة على حدة، الأمر الذي سيخفض المقاومة للعلاج ويقلل حالات النكس مما سيؤدي إلى سيطرة أفضل على الداء وصولاً إلى مكافحته والحد من انتشاره.

5. الاستنتاجات:

- جميع الاصابات بداء الليشمانيات الجلدي في هذه الدراسة نتجت عن النوع *L. tropica* .
- وجود فروق واضحة في درجة الحساسية الدوائية بين العزلات المحلية تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية.
- يمتلك مركب بنتوستام فعالية تثبيطية أعلى من مركب الغلوكانتيم على الأشكال أمامية السوط لطفيلي اللشمانيا المدارية.

6.المراجع:

1. Aït-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., *et al.* (2011). *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitology research, 109*, 1225-1232 .
2. Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., *et al.* (2017). *Leishmania* infections :Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine, 57*, 1-29 .
3. Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, *et al*. (2016). *Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Clinical infectious diseases*, 63(12), e202-e264.
4. Al-Nahhas, S. A., & Kaldas, R. M. (2013). Characterization of *Leishmania* species isolated from cutaneous human samples from central region of Syria by RFLP analysis. *International Scholarly Research Notices, 2013* .
5. Ashutosh, Sundar, S., & Goyal, N. (2007). Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of medical microbiology, 56*(2), 143-153 .
6. Beig, M., Oellien, F., Garoff, L., *et al.* (2015). Trypanothione reductase: a target protein for a combined in vitro and in silico screening approach. *PLoS neglected tropical diseases, 9*(6), e0003773 .
7. Bhandari, D., Guha, K., Bhaduri, N., *et al.* (2011). Ubiquitination of mRNA cycling sequence binding protein from *Leishmania donovani* (LdCSBP) modulates the RNA endonuclease activity of its Smr domain. *FEBS letters, 585*(5), 809-813 .
8. Brandonisio, O., & Spinelli, R. (2002). Immune response to parasitic infections-an introduction. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, *2*(3), 193-199 .
9. Chargui, N., Amro, A., Haouas, N., *et al.* (2009). Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *International Journal for Parasitology, 39*(7), 801-811 .
10. Decuypere, S., Rijal, S., Yardley, V., *et al.* (2005). Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb (V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49*(11), 4616-4621.
11. Demicheli, C., Frézard, F., Lecouvey, M., *et al.* (2002). Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1570*(3), 192-198 .
12. Demicheli, C., Santos, L. S., Ferreira, C .S., *et al.* (2006). Synthesis and characterization of Sb (V)–adenosine and Sb (V)–guanosine complexes in aqueous solution. *Inorganica Chimica Acta, 359*(1), 159-167 .
13. Denton, H., McGREGOR, J. C., & Coombs, G. H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochemical Journal, 381*(2), 405-412 .
14. El Tai, N., Osman, O., El Fari, M., *et al.* (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania* donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94*(5), 575-579 .
15. Ephros, M., Bitnun, A., Shaked, P., *et al.* (1999). Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43*(2), 278-282 .
16. Fairlamb, A. H., & Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual review of microbiology, 46*(1), 695-729 .
17. Ferreira, C. S., Rocha, I., M Neto, R. L., *et al.* (2010). Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of SbV-ribonucleoside complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society, 21*, 1258-1265 .
18. Frezard, F., Demicheli, C., Kato, K. C., *et al.* (2013). Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. *Reviews in Inorganic Chemistry, 33*(1), 1-12 .
19. Frézard, F., Demicheli, C., & Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules, 14*(7), 2317-2336 .
20. Frézard, F., Martins, P. S., Barbosa, M. C., *et al.* (2008). New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *Journal of inorganic biochemistry, 102*(4), 656-665 .

21. Gainey, D., Short, S., & McCoy, K. L. (1996). Intracellular location of cysteine transport activity correlates with productive processing of antigen disulfide. *Journal of cellular physiology, 168*(2), 248-254 .
22. Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., *et al.* (2004). Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *Journal of Biological Chemistry, 279*(30), 31010-31017
23. Hadighi, R., Boucher, P., Khamesipour, A., *et al.* (2007). Glucantime-resistant Leishmania tropica isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. *Parasitology research, 101, 1319-1322*.
24. Hide, M., Marion, E., Pomares, C., *et al.* (2013). Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. *International Journal for Parasitology, 43*(5), 389-397 .
25. Jeddi, F., Piarroux, R., & Mary, C. (2011). Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. *Journal of tropical medicine, 2011* .
26. Laity, J. H., Lee, B. M., & Wright, P. E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current opinion in structural biology, 11*(1), 39-46 .
27. Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., *et al.* (2001). The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *Journal of Biological Chemistry, 276*(28), 26301--26307
28. Leon, O., & Roth, M. (2000). Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. *Biological research, 33*(1), 21-30 .
29. Lucumi, A., Robledo, S., Gama, V., *et al.* (1998). Sensitivity of *Leishmania viannia* panamensis to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42*(8), 1990-1995 .
30. Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., *et al.* (1996). Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 93*(19), 10383-10387 .
31. Naderer, T., & McConville, M. J. (2008). The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology, 10*(2), 301-308 .
32. Organization, W. H. (2023). *Determining discriminating concentrations of insecticides for monitoring resistance in sand flies: report of a multi-centre laboratory study and WHO expert consultations*: World Health Organization.
33. Özbilgin, A., Çavuş, İ., Kaya, T., *et al.* (2020). Comparison of in vitro resistance of wild *leishmania* isolates, which are resistant to pentavalent antimonial compounds, against drugs used in the treatment of leishmaniasis. *Turkiye parazitolojii dergisi, 44*(1), 12-16 .
34. Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C ،*.et al.* (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS neglected tropical diseases, 11*(12), e0006052 .
35. Roberts, W. L., McMurray, W. J., & Rainey, P. M. (1998). Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42*(5), 1076-1082 .
36. Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P., *et al.* (2003). Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 100*(19), 11007-11012 .
37. Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitology research, 120*, 1541-1554 .
38. Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M., *et al.* (2001). Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania* donovani. *Journal of Biological Chemistry, 276*(6), 3971-3976 .
39. Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., *et al.* (2018) Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta histochemica, 120*(3), 159-167 .
40. Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., *et al.* (2000). Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical infectious diseases, 31*(4), 1104-1107 .
41. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., *et al.* (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research, 6* .

42. Van der Auwera, G., & Dujardin, J.-C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews, 28*(2), 265-294 .
43. Walker, J., & Saravia, N. G. (2004). Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *Journal of parasitology, 90*(5), 1155-1162 .
44. Wyllie, S., Cunningham, M. L., & Fairlamb, A. H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania* donovani. *Journal of Biological Chemistry, 279*(38), 39925-39932 .
45. Yesilova, Y., Surucu, H. A., Ardic, N., *et al.* (2016). Meglumine antimoniate is more effective than sodium stibogluconate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Dermatological Treatment, 27*(1), 83-87 .
46. Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., *et al.* (2004). *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *Journal of Biological Chemistry, 279*(36), 37445-37451 .