Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 41 No.3 (2025): 84-98

مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 41-عدد 3 (2025): 84- 98

دراسة القدرة الإخماجية لعزلات محلية من اللشمانيا المدارية وتحديد درجة حساسيتها لمركب أمفوتريسين B في المختبر

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 طفيلي اللشمانيا *Leishmania* من النوع *L. tropica* المسبب الرئيس لداء اللشمانيات الجلدي Cutaneous leishmaniasis (CL) في جميع المحافظات السورية، حيث تُستخدم حالياً مركبات الأنتيموان الخماسية Sb(V) pentavalent antimony بمفردها أو بالمشاركة مع أدوية الخط الثاني مثل مركب أمفوتريسين B amphotericin B B لعلاج هذا الداء، ولم تعد النتائج العلاجية عند تطبيق هذه الأدوية مثالية كما كانت سابقاً، مما يشير لوجود درجات مختلفة من الحساسية الدوائية والتي تعكس أنماطاً ظاهرية متعددة، وبالتالي أضحت الحاجة ملحّة لتقييم القدرة الإخماجية لطفيليات اللشمانيا ودرجة حساسيتها الدوائية وخصوصاً تجاه مركب أمفوتريسين B في حال استدعت الحاجة إلى تطبيقه بشكل أوسع. وبناءً على ما سبق هدفت هذه الدراسة إلى توصيف عزلات محلية من النوع *L. tropica* من حيث قدرتها على خمج البلاعم البشرية وتقييم درجة حساسيتها لمركب أمفوتريسين B في المختبر.

تم في هذا العمل تحديد التركيز المثبط للنصف IC_{50} لأربع عزلات محلية (L1 – L4) من النوع *L. tropica* بعد 24 ساعة من معالجتها بمركب أمفوتريسين B، كما تم عزل وحيدات النوى من الدم المحيطي البشري واستكمال تمايزها إلى بلاعم ثم خمجها بالأشكال أمامية السوط Promastigote من طفيلي اللشمانيا لتحديد نسبة البلاعم المُخمجة بالإضافة إلى الحمل الطفيلي داخلها.

أظهرت قيم IC_{50} وجود اختلافات في درجة الحساسية الدوائية بين العزلات الأربعة تجاه مركب أمفوتريسين B، كما بينت نتائج الإخماجية والحمل الطفيلي وجود فروقات معنوية بين العزلة L3 وباقي العزلات الأخرى مع ملاحظة أن العزلة L3 هي العزلة الأقل مقاومة لمركب أمفوتريسين B والأعلى قدرة إخماجية للبلاعم في نفس الوقت.

الكلمات المفتاحية: داء اللشمانيات الجلدي، اللشمانيا المدارية، مركب أمفوتريسين B، البلاعم، القدرة الإخماجية، الحمل الطفيلي.

تاريخ الإيداع: 2024/01/24
تاريخ الموافقة: 2024/02/29

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

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Study of Infectivity Ability of Local Isolates of *Leishmania Tropica* and Determination the Degree Of Susceptibility to Amphotericin B *In Vitro*

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:

Leishmania tropica is considered the main species that causes cutaneous leishmaniasis (CL) in all Syrian governorates. Current treatments are based on pentavalent antimony compounds which are used to treat this disease alone or in combination with second-line drugs such as amphotericin B. Recently, therapeutic results of these drugs have become less than ideal, that reflects the presence of different degrees of drug sensitivity and various phenotypes. Therefore, it is necessary to evaluate the local *Leishmania* isolates in terms of infectious ability and the degree of sensitivity, specifically to amphotericin B, in case it will be used more widely in future.

Based on previous facts, this study aimed to characterize these local isolates of *L. tropica* in terms of their infectious ability to human macrophages *in vitro* and evaluate the susceptibility of these isolates to amphotericin B.

This research was done by calculating the Half-maximal inhibitory concentration (IC50) for four local isolates (L1 – L4) after treatment with (AmB) for 24 hours, and monocytes were isolated from human peripheral blood and differentiation into macrophages, then infected by promastigotes of *Leishmania* Parasites for determination the percentage of infected macrophages and the parasite burden.

The values of IC50 revealed different degrees of susceptibility to (AmB) between four isolates. in addition, our results represented significant differences between L3 isolate and others in terms of infectivity ability and parasite burden. Finally, it is worth noting that the third isolate (L3) was the most infectious to macrophages and the lowest resistant to amphotericin B at the same time.

Received :2024/01/24
Accepted:2024/02/29

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

Key Words: Cutaneous Leishmaniasis, *L. tropica*, Amphotericin B, Macrophage, Infectious Ability, Parasite Burden .

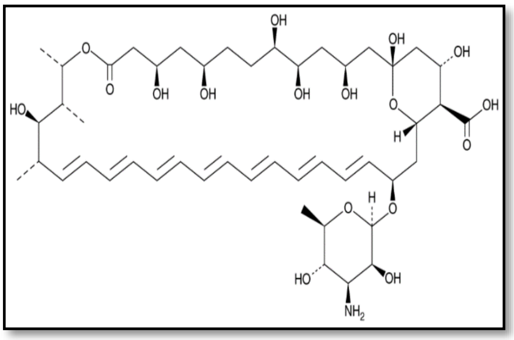
1. المقدمة:

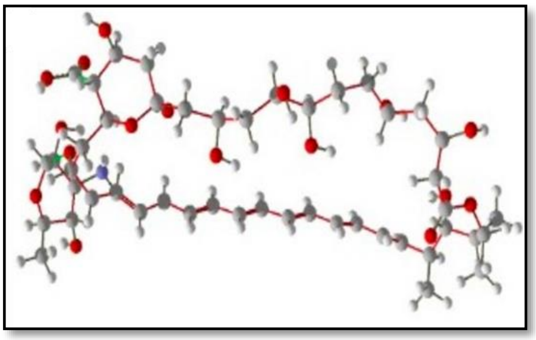
ينتشر داء اللشمانيات Leishmaniasis ضمن نطاق جغرافي واسع يمتد عبر جميع القارات باستثناء أستراليا والقارة القطبية الجنوبية، ليشمل 90 دولة من بينها دول منطقة الشرق الأوسط، ويعد داء اللشمانيات _وفقاً لتقارير منظمة الصحة العالمية World (WHO) Health Organization _ ثاني أخطر الأمراض المدارية المهملة بعد الملاريا، حيث يسجّل سنوياً حدوث أكثر من مليون إصابة جديدة (Singh *et al.*, 2021).

يُسبّب داء اللشمانيات طفيلي وحيد خلية من جنس اللشمانيا *Leishmania*، تنقله إلى الإنسان أنثى ذبابة الرمل Sand fly (Sasidharan & Saudagar, 2021)، ويتعاقب على دورة حياة هذا الطفيلي شكلان إعاشيان هما الشكل أمامي السوط Promastigote، الذي يأخذ مظهراً متطاولاً مغزلياً طوله (10–20 µm) ينبثق منه سوط متحرك، ويعيش هذا النمط داخل المضيف اللافقاري الناقل وفي أوساط الاستنبات عند درجة حرارة 26 مْ، بعدها يتحول هذا النمط إلى الشكل داخلي السوط Amastigote ضمن البالعات الكبيرة للمضيف الفقاري أو في أوساط الاستنبات عند درجة حرارة 37 مْ حيث يأخذ شكلاً دائرياً أو بيضوياً قطره (3– 7 µm) لا ينبثق منه سوط (Naderer & McConville, 2008; Rubin-Bejerano *et al.*, 2003).

تصيب العديد من أنواع طفيلي اللشمانيا الإنسان وينتج عنها ثلاثة أشكال سريرية رئيسة هي: داء اللشمانيات الجلدي Cutaneous Leishmaniasis (CL) بنمطيه الجاف (Dry Type) والرطب (Wet Type) وداء اللشمانيات الجلدي المخاطي Muco-Cutaneous Leishmaniasis (MCL) وداء اللشمانيات الحشوي Visceral Leishmaniasis (VL)، حيث تختلف التظاهرات السريرية الناتجة عن الإصابة بطفيليات اللشمانيا بحسب نوع الطفيلي المتسبب ونوع النسيج المستهدف، ويعد داء اللشمانيات الجلدي أكثرها انتشاراً وتوطناً في الشرق الأوسط، ويسببه في أغلب الحالات النوعان *L. major* و*L. Tropica* (Torres- Guerrero *et al.*, 2017). وعلى الرغم من الجهود المبذولة من قبل المنظمات والدوائر الصحية لتطوير لقاح مناسب ضد داء اللشمانيات إلا أن مكافحة هذا الداء لا تزال تعتمد بشكل أساسي على زمر دوائية قليلة أهمها مركبات الأنتيموان خماسية التكافؤ Pentavalent Antimonials Sb(V) كخط أول في علاج داء اللشمانيات منذ 80 عاماً، وفي السنوات الماضية تتالت التقارير التي تتحدث عن ظهور مقاومة كبيرة من قبل أنواع اللشمانيا المختلفة تجاه هذه المركبات (Ashutosh *et al.*, 2007; Brandonisio & Spinelli, 2002)، حيث تعود مقاومة طفيليات اللشمانيا لدواء ما 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 لطفيليات اللشمانيا والاختلافات الوراثية بين سلالات النوع الواحد إلى وجود أنماط ظاهرية متعددة ترتبط بدرجات مختلفة من الحساسية الدوائية ولقد بينت العديد من الدراسات وجود ارتباط بين الأنماط الجينية المتغايرة واختلاف الأنماط الظاهرية والسريرية في سلالات النوع الواحد (Chargui *et al.*, 2009; Hide *et al.*, 2013) وبالتالي فإن ظهور السلالات المقاومة لمركبات الأنتيموان الخماسية في منطقة جغرافية ما يزيد من أهمية تطبيق أدوية الخط الثاني مثل مركب أمفوتريسين B amphotericin B (Amp B) وخصوصاً عند حدوث حالات الفشل العلاجي Treatment Failure وظهور أشكال سريرية غير نمطية لداء اللشمانيات Atypical leishmaniasis (Mosimann *et al.*,2018; Wortmann *et al.*,2010).





A **B**

الشكل (1). البنية الكيميائية لمركب أمفوتريسين B

A: هيكل ثنائي البعد. B : هيكل ثلاثي الأبعاد (Khosravi *et al.*, 2022)

يندرج مركب (Amp B) ذو الصّيغة الكيميائية C47H73NO17 الموضحة في الشكل (1) تحت زمرة عديدات الروابط المضاعفة (Polyenes)(Tiwari *et al.*, 2019.) وقد تم استخلاصه من النوع الجرثومي *Streptomyces nodosus* واستخدم لعقود طويلة كمضاد فطري واسع التأثير ومتعدد الأهداف نظراً لآلية عمله متعددة العوامل Multifactorial Mode Of Action (MOA) والتي تستهدف عدة مسارات حيوية في الطفيلي (Mesa-Arango *et al.*, 2012; Purkait *et al.*, 2012) حيث يتجلى المسار الأول بقدرة مركب (Amp B) على الارتباط بالأرغسترول (Ergosterol) في الغشاء الخلوي للطفيلي، حيث يعد الأرغسترول بديل الكوليسترول في الغشاء الخلوي لخلايا الثدييات ويؤدي دور هام في الحفاظ على السيولة الغشائية Membrane Fluidity وتماسك بنية الطفيلي وحمايته من الضغط المحيطي الخارجي وبالتالي فإن استنزاف مستويات الأرغسترول ضمن الخلية يؤدي إلى إضعافها بنيوياً مما ينتج عنه انخفاض في عيوشية الطفيلي وفوعته بالإضافة إلى تراجع قدرة الطفيلي على تحمل الإجهاد التأكسدي ضمن البالعات، أما المسار الثاني فيتضمن إحداث ثقوب ضمن الغشاء الخلوي للطفيلي من خلال تكوين مجاميع (أرغستيرول–Amp B) مما يسمح بحرية عبور الشوارد المختلفة (K^+.H^+،Cl^-،Na^+) وانتشارها على طرفي الغشاء محدثاً خللاً كبيراً في الوظائف الحيوية للطفيلي (Gray *et al.*, 2012).

يتجلى المسار الثالث من خلال تأثير مركب (Amp B) على مستويات التعبير الجيني لعدد من الجينات الهامة كالجينات المسؤولة عن سبيل الاصطناع الحيوي للأرغسترول Ergosterol Biosynthetic Pathway مثل أنزيم سكوالين سينثاز Squalene synthase وأنزيم سكوالين إيبوكسيداز Squalene epoxidase وأنزيم لانوستيرول ديميثيلاز Lanosterol 14-alpha demethylase (T. T. Liu *et al.*, 2005; Vranová *et al.*, 2013) بالإضافة إلى التأثير على التعبير الجيني للجينات المرتبطة بالشدة التأكسدية بطريقة تحقق الوصول إلى الضغط التأكسدي اللازم للاستموات، فمثلاً إن زيادة التعبير عن جين Ascorbate Peroxidase (LdAPx) يؤدي إلى تشكيل Reactive Oxygen Species (ROS) ورفع مستويات شاردة الكالسيوم داخل الخلية وتفعيل شلال الاستموات الداخلي (سبيل سيتوكروم C) (Kumar *et al.*, 2014; T. T. Liu *et al.*, 2005).

إن آلية عمل مركب (Amp B) المضادة لطفيلي اللشمانيا في المسار الرابع هي آلية غير مباشرة تنتج عن ألفته للكوليسترول (Cholesterol) أحد أهم مكونات الغشاء الخلوي لخلايا المضيف الفقاري مما يؤدي إلى خلل في عمل المستقبلات الغشائية، وبالتالي فإن ارتباط مركب (Amp B) مع الكوليسترول في أغشية البلاعم تؤثر سلباً على المستقبلات التي يرتبط بها طفيلي اللشمانيا مما يؤدي إلى إعاقة دخوله للبلاعم وخفض قدرته الإخماجية (Chattopadhyay & Jafurulla, 2011).

بالإضافة إلى كل ما سبق فإن مركب (Amp B) ولأسباب غير معروفة يفعّل مستقبلات Toll-Like Receptor (TLR) في البلاعم مما يؤدي إلى بدء سلسلة من الإشارات الخلوية وتحريض إنتاج Nitric Oxide (NO) وبعض السيتوكينات مثل Interleukin-1 (IL-1) وبالتالي قتل العامل الممرض داخل البالعة (Mesa-Arango *et al.*, 2012).

تقوم الأشكال أمامية السوط بخمج البلاعم من خلال ارتباط المستقبلات الغشائية للبلاعم إلى جزيئات نوعية موجودة على سطح الطفيلي وتفعيل السبيل المتناوب لبروتينات جملة المتممة، حيث تؤدي المستقبلات الغشائية التالية Complement Receptor CR1, CR3 (Mac-1), Fibronectin Receptor (FnR) دوراً مهماً في عملية ربط الأشكال أمامية السوط الممشوقة metacyclic promastigotes إلى سطح البالعات الكبيرة وبلعمتها (Kane & Mosser, 2000)، وعلى الرغم من الأهمية الكبيرة لمستقبلات مانوز– فوكوز Mannose-Fucose Receptor (MFR) في ارتباط الطفيلي إلى البالعات الكبيرة، فإن السلالات شديدة الفوعة من طفيلي اللشمانيا تتجنب قدر الإمكان الارتباط بها وتكتفي بالارتباط إلى المستقبل CR3 لمنع تنشيط NADPH oxidase وتعزيز بقائها داخل البالعة، هذا من جهة البلاعم أما من جهة طفيلي اللشمانيا فإن الجزيئات السطحية الدهنية تعد أساسية في التآثر مع خلايا المضيف وبدء عملية البلعمة حيث يتم استهدافها من قبل مكون المتممة C3 (C3b/iC3b) (D. Liu & Uzonna, 2012) ، لاسيما البروتين السكري الغشائي Glycoprotein 63 (GP63) الذي يتشابه في الخواص الجزيئية مع بروتينات الفيبرونكتين بسبب احتوائه على التتالي RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) مما يسمح للأشكال أمامية السوط باستخدام مستقبلات الفيبرونكتين على سطح البلاعم للارتباط بها، وأيضاً يتشابه مع المكون الثالث C3 بسبب احتوائه على التتالي الأميني RGD (Arg-Gly-Asp) مما يسمح للطفيلي بالارتباط مع مستقبله على البلاعم مباشرة حتى في غياب المصل كما هو الحال عند خمج البلاعم بطفيلي اللشمانيا في المختبر *in vitro* (Rizvi *et al.*, 1988; Russell & Wright, 1988)، كما يعد البروتين السكري Lipophosphoglycan (LPG) عاملاً مهماً في مراحل العدوى الأولية ودخول الأشكال أمامية السوط إلى البلاعم من خلال ارتباطه إلى مستقبل المكون الثالث CR3 ومستقبل الأنتغرين (p150/95) بالإضافة إلى مستقبلات مانوز– فوكوز (MFR) (Chakraborty *et al.*, 1998; Mosser & Brittingham, 1997)

بعد دخول طفيلي اللشمانيا إلى البالعة يتحول إلى الشكل داخلي السوط ويستقر ضمن الفجوات البلعمية، ويبدأ بالانقسام حيث يحافظ على قيمة pH ملائمة من خلال ضخ البروتونات خارج الطفيلي بفضل مضخة بروتونات – بوتاسيوم (H^+/K^+-ATPases) (Marchesini & Docampo, 2002)، ويعتمد الطفيلي في هذه المرحلة المبكرة على الجزيئات السطحية Lipophosphoglycan (LPG) في تثبيط فعالية أنزيم بروتين كيناز–C Protein kinase C (PKC) ومنع فسفرة بروتينات الطفيلي وبالتالي ضمان بقائه داخل الفجوة البلعمية ضمن هذه الشروط القاسية (Giorgio *et al.*, 2003; Giorgione *et al.*, 1996) كما أن عملية انتقال طفيلي اللشمانيا من المضيف الناقل إلى المضيف الخازن والتي تشابه عملية تحول الأشكال أمامية السوط إلى الأشكال داخلية السوط في المختبر تفرض على الطفيلي إجهاداً حرارياً يقارب 10 درجات مئوية، حيث يتعامل الطفيلي مع هذه الفروقات الحرارية من خلال إنتاج متزايد لأنماط مختلفة من بروتينات الصدمة الحرارية Heat Shock Proteins (HSPs) (Gupta *et al.*, 2022)

أهمية البحث وأهدافه:

إنّ الانتشار الواسع لداء اللشمانيات الجلدي في الجمهورية العربية السورية، مع غياب استراتيجية واضحة في تدبير هذا الداء والتحكم به، بالإضافة إلى الاستعمال المكثف لمركبات الأنتيموان الخماسية في علاج هذا الداء والتي قد تكون في كثير من الحالات إجراءات منقوصة أو غير مكتملة، أدّى إلى تسجيل زيادة في عدد حالات الفشل العلاجي عند تطبيق أدوية الأنتيموان الخماسية، وبالتالي أصبح من الضروري إجراء تقييم حقيقي لبعض العزلات المحلية من حيث درجة الحساسية لأدوية الصف الثاني مثل مركب (Amp B) قبل استعمالها كخيار بديل في تدبير الحالات المزمنة أو الناكسة، كما أنّ تشخيص العديد من الحالات غير النمطية لمرضى مصابين بالداء الجلدي يدعو إلى تحري أنماط ظاهرية أخرى للطفيليات المعزولة من هؤلاء المرضى وخصوصاً تلك التي تسهم في غزو وانتشار طفيلي اللشمانيا من خلال قدرته على خمج البلاعم والتكاثر داخلها، وبناءً على ما سبق هدف هذا البحث إلى دراسة النمط الظاهري لعزلات محلية من اللشمانيا المدارية من حيث درجة حساسيتها لمركب (Amp B) وقدرتها على خمج البلاعم البشرية.

2. مواد البحث وطرائقه:

1.2.استنبات الطفيلي:

تم استخدام أربع عزلات محلية من طفيليات اللشمانيا المدارية المستنبتة والمنمّطة سابقاً في مختبر البحوث (1) بقسم علم الحياة الحيوانية في كلية العلوم بجامعة دمشق، حيث نقلت هذه الطفيليات من وسط N.N.N بتركيز بدئي 2×10^6 إلى 5 ml من وسط زرع سائل (Sigma) RPMI-1640 مدعّم بـ 10% من مصل البقر الجنيني FBS (Sigma) Fetal Bovine Serum منزوع المتممة بالتسخين، و0.5 mmol/l من الغلوتامين L-glutamine (Sigma) والمضاف له الصادين الحيويين (ستربتومايسين Streptomycin وبنسلين Penicillin) بتركيز 100 unit/ml وحضنت هذه المستنبتات الطفيلية في درجة حرارة 26 مْ مع المراقبة اليومية من حيث العدد والشكل والنشاط بدءاً من بداية الطور اللوغاريتمي Logarithmic Phase حتى الوصول إلى طور الاستتباب Stationary Phase .

2.2. حساب نسب التثبيط المئوية لطفيلي اللشمانيا باستخدام مقايسة MTT وتحديد قيم التراكيز المثبطة للنصف IC50 من مركب أمفوتريسين B

تم استخدام المقايسة اللونية (MTT) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide لتقييم النشاط الاستقلابي وعيوشية طفيليات اللشمانيا في المختبر *in vitro*، حيث تقوم إنزيمات الأكسدة والاختزال في الخلايا الحية بإرجاع أملاح التيترازوليوم Tetrazolium الصفراء إلى مركب الفورمازان Formazan البنفسجي، لتتناسب شدة اللون الناتج طرداً مع نسبة عيوشية الخلايا (Stockert *et al.*, 2018).

تم قياس عيوشية الأشكال أمامية السوط من طفيليات اللشمانيا، باستخدام صفائح 96 بئر تحوي حجم نهائي من وسط الزرع قدره 100 µl بالإضافة إلى عدد ثابت 8×10^5 من طفيليات اللشمانيا في كل بئر، بعد معالجتها بسلسلة من التراكيز المتدرجة من مركب أمفوتريسين B (Sigma) (0.0084µM– 0.01687µM– 0.03375µM–0.0675µM) بالإضافة إلى شاهد غير معالج من كل عزلة، حيث تم الحضن لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 26 مْ، بواقع مكررين لكل تركيز، ثم أضيف لكل بئر 10 µl من محلول (MTT) وتم الحضن لمدة 3 ساعات عند درجة حرارة 26 مْ، ثم حلت بلورات الفورمازان المتشكلة بإضافة 100 µl من مادة (DMSO) مع الرج لمدة 10 دقائق، وتم قياس امتصاصية الآبار على جهاز مطياف ضوئي قارئ صفائح (Humareader®) عند طول موجة 540 nm، ثم حُسبت النسبة المئوية للتثبيط عند كل تركيز من خلال المعادلة التالية:

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

بالاعتماد على نسب التثبيط المئوية الناتجة تم حساب قيم IC50 لكل عزلة من العزلات الأربعة باستخدام البرنامج الإحصائي GraphPad Prism الإصدار (9.5.1) كما سيرد في فقرة الدراسة الإحصائية.

3.2.عزل البلاعم البشرية من الدم المحيطي:

تم عزل الخلايا وحيدات النوى من الدم المحيطي البشري باستخدام مادة الفايكول (Ficoll) Histopaque®-1077 باتباع الخطوات المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة Sigma-Aldrich حيث جُمع (15 ml) من الدم المحيطي البشري ضمن أنابيب (EDTA) وقلّبت بلطف عدة مرات لمنع تكوّن خثرات دموية، ووضعت الأنابيب بشكل أفقي بدرجة حرارة 20 مْ مع الرج بلطف قبل البدء بعملية الفصل، ومددت العينة الدموية بإضافة حجم مماثل (15 ml) من الدارئة PBS/EDTA .

أُضيف المزيج السابق ببطء إلى أنبوب يحوي 15ml من مادة الفايكول (1077)، ثم ثفل الأنبوب السابق وفق الشروط التالية: 800g/30min/RT°/acc.1/decc0/ لتتوضّع طبقة الكريات البيضاء وحيدات النوى واللمفاويات على شكل غلالة بيضاء بين طبقتين: البلازما (في الأعلى) والفايكول (في الأسفل) حيث تم التخلص من القسم الأكبر من البلازما وسحبت الغلالة البيضاء باستخدام الماصة بهدوء تام ونُقلت الى أنبوب جديد، حيث علّقت في 1ml من الدارئة PBS/EDTA ومددت إلى حجم نهائي 40ml من

الدارئة نفسها ثم ثقلت وفق الشروط التالية: /400g/15min/RT°/acc.5/decc0، أزيل بعد ذلك السائل الطافي وأضيف 3ml من دارئة حل الكريات الحمراء RBC lysis buffer 1x (NH4Cl0.15M-KHCO3 10Mm-EDTA0.1Mm) وحرك المزيج السابق بحذر حتى تمام انحلال الراسب الأحمر، وحضنت على الثلج لمدة 30S، ثم أضيف لها 40ml من دارئة PBS/EDTA لإيقاف عمل دارئة حل الكريات الحمراء، ثم ثقل المزيج السابق وفق الشروط التالية: /200g/15min/RT°/acc.5/decc5، ثم تم التخلص من الطافي وعلّقت الرسابة الحاوية على الخلايا في 1ml من الوسط الكامل (IMDM,10%FBS,Pen/Strep)1X وتم عد هذه الخلايا باستعمال ملون أزرق التريبان Ttrypan Blue وحُدد عدد الخلايا الحية والحجم الذي يجب أخذه لزراعة $5x10^4$ خلية في كل بئر من آبار صفيحة الزرع 96 ، تم توزيع الخلايا بالعدد المطلوب ضمن الآبار وأضيف لكل بئر 100 µl من وسط الزرع IMDM الكامل، وحضنت هذه الخلايا في درجة الجرارة 37 مْ لمدة ساعتين، بعدها تم التخلص من الوسط السابق وغسلت الخلايا بدارئة PBS1X مرتين لإزالة الخلايا اللمفاوية التي لم تلتصق بسطح الصفيحة وأضيف وسط جديد وأعيدت الصفيحة إلى الحاضنة عند درجة حرارة 37 مْ و5% CO_2، تم تغيير الوسط كل ثلاثة أيام حتى استكمال تمايز الخلايا وحيدات النوى إلى بلاعم حيث استغرقت هذه العملية حوالي 9 أيام من بدء الزرع.

4.2. خمج البلاعم بالأشكال أمامية السوط من طفيلي اللشمانيا المدارية:

تم اختبار القدرة الإخماجية للأشكال أمامية السوط الممشوقة metacyclic promastigote على البلاعم بعد اكتمال تمايزها وفق الآتي:
بهدف تحديد العدد اللازم إضافته من طفيليات كل عزلة لتحقيق النسبة: 5 طفيليات لكل بالعة واحدة، ثقل 3 ml من المستنبت الطفيلي بسرعة 2900 rpm لمدة 7 min، وتم التخلص من الطافي ثم غسلت الرسابة بدارئة PBS1X وعلقت ب 1ml من وسط الزرع RPMI-1640، ثم أخذ 10 µl من المعلق الطفيلي وثبت بحجم مماثل من الفورم ألدهيد 0.1% وتم عد الطفيليات باستعمال عدادة neubauer بهدف تحديد تركيز الطفيلي لكل عزلة من العزلات الأربعة، ثم نقلت حجوم مناسبة من هذه المعلقات ومددت للحصول على تركيز 200 ألف طفيلي لكل 100 µl، ثم أضيفت إلى آبار الصفيحة.
حضنت الصفيحة لمدة 4 ساعات في الدرجة 37 مْ للسماح لطفيليات اللشمانيا أمامية السوط بخمج البلاعم البشرية، والتحول داخلها إلى الأشكال داخلية السوط amastigote، بعدها غسلت بدارئة PBS1X ثلاث مرات للتخلص من الطفيليات التي بقيت خارج البلاعم، ثم أضيف 100µl من وسط IMDM الكامل إلى كل بئر من آبار الصفيحة و أعيدت إلى الحاضنة عند درجة حرارة 37 مْ و5% CO_2.
بعد مرور 24 ساعة ثبتت العينات بالميتانول ثم لونت بملون غيمزا 10% وباستخدام التكبير 40X في المجهر المقلوب تم عد 100 بالعة وتسجيل البيانات التالية: عدد البلاعم المخمجة – عدد البلاعم غير المخمجة – عدد الطفيليات داخلية السوط داخل كل بالعة مخمجة.

6.2. الدراسة الإحصائية:

تم إجراء الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج GraphPad Prism الإصدار (9.5.1)، حيث دُرس تأثير التراكيز المتدرجة من مركب أمفوتريسين B (المتغير المستقل) على نسب التثبيط المئوية (المتغير التابع) لكل عزلة وقيّمت العلاقة بينهما وفق معامل الارتباط بيرسون Pearson's R وتمّت مقارنة الاختلافات بين العزلات الأربعة من حيث قيم IC50 ومعدّل الحمل الطفيلي وفق اختبار تحليل التباين (ANOVA) واختبار توكي متعدد المقارنات Tukey'smultiple comparisons test وطبّق اختبار مربع كاي Chi-square لمقارنة الاختلافات في النسب المئوية للبلاعم المخمجة بطفيلي اللشمانيا بين العزلات الأربعة. كررت جميع التجارب ثلاث مرات (n=3)، وتم 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 وتمّ التعبير عن النتائج باحتساب المتوسط ± الانحراف المعياري mean±SD، واعتبرت الاختلافات معتد بها احصائياً عند $P<0.05$.

3. النتائج:

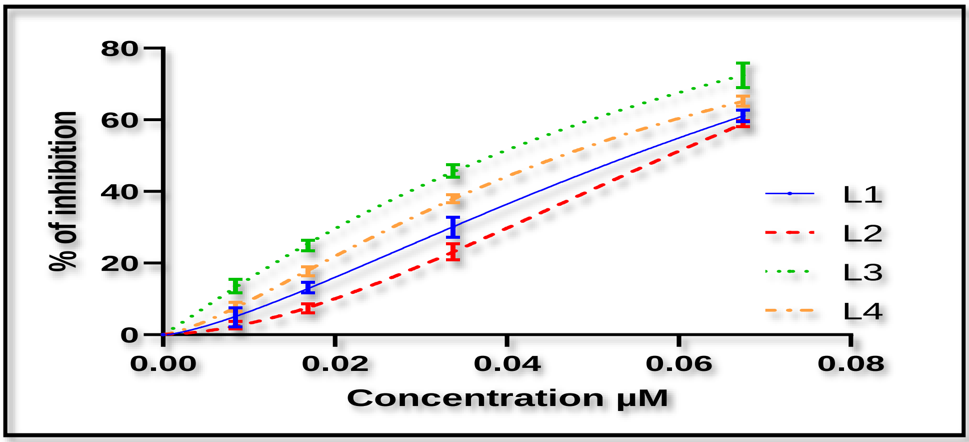
1.3. حساب نسبة تثبيط الطفيليات بمقايسة MTT:

تم حساب نسب التثبيط المئوية للعزلات الطفيلية الأربعة بالاعتماد على قيم الامتصاصية اللونية لمركب الفورمازان البنفسجي المنحل بعد 24 ساعة من معالجة الأشكال أمامية السوط بمركب (Amp B)، وجاءت النتائج كما هو موضح في الجدول (1).

الجدول (1). نسب التثبيط المئوية الناتجة عن معالجة طفيليات العزلات الأربع (L1-L4) بمركب أمفوتريسين B بعد24 ساعة

	نسبة التثبيط %			
	0.0675 µM	**0.0337 µM**	**0.0168 µM**	**0.0084 µM**
L1	61.113±1.610	30.040±2.816	13.153±1.397	4.827±2.644
L2	58.880±0.917	23.173±2.195	7.357±1.213	2.717±1.001
L3	72.417±3.441	45.710±1.737	24.907±1.491	13.573±1.916
L4	65.137±1.440	37.983±1.069	17.717±1.233	7.800±1.290

عند دراسة علاقة الارتباط بين التراكيز المتدرجة من مركب أمفوتريسين B ونسبة التثبيط المئوية لهذه التراكيز تبين وجود علاقة ارتباط إيجابية بين زيادة تراكيز (Amp B) من جهة وارتفاع نسب التثبيط المئوية في العزلات الأربعة من جهة أخرى، حيث كانت أقل قيمة لمعامل الارتباط بيرسون أعلى من 0.9 عند قيم معنوية $p<0.05$ كما يظهر الشكل (2).



الشكل (2). المنحنيات البيانية الناتجة عن رسم العلاقة بين نسب التثبيط المئوية وتدرج تراكيز مركب أمفوتريسين B للعزلات المحلية الأربعة

يلخص الجدول (2) قيمة الجرعة المثبطة للنصف IC50 لكل عزلة مرفقاً بالتحليلات الإحصائية الناتجة عند مستوى ثقة 95%.

الجدول (2). الجرعة المثبطة للنصف IC_{50} مقدرة ب µM لكل عزلة من العزلات المحلية الأربع

Isolates	IC50	Confidence Intervals (CI)	R^2 value
L1	0.056±0.002	0.0526 to 0,0607	0.961
L2	0.060±0.003	0.0575 to 0.0628	0.980
L3	0.042±0.003	0.0373 to 0.0484	0.934
L4	0.051±0.001	0.0461 to 0.0523	0.944

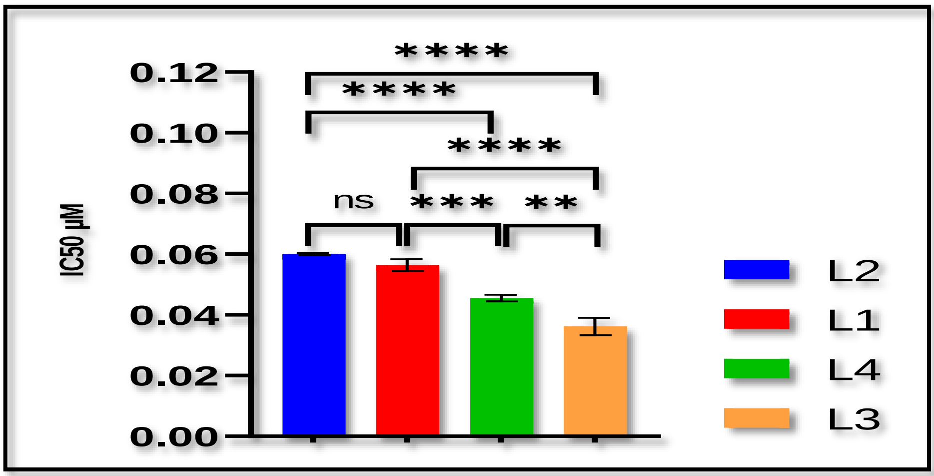
حيث أن: العزلات (L1-L4) أعطت قيم IC50 حقيقية حيث وقعت ضمن مجال الثقة CI وفق معامل تحديد R^2 مرتفع

يبين الجدول (3) نتائج التحليل الإحصائي لاختبار توكي متعدد المقارنات عند تطبيقه على قيم IC50 كل عزلة ومقارنتها مع قيم IC50 العزلات الأخرى حيث نلاحظ وجود فروق معنوية بين مثنويات العزلات الآتية: (L3,L4) و(L1,L3) و(L2,L3) و(L1,L4) و(L2,L4) بينما لم تظهر العزلتين L1 وL2 أي فروق معنوية بينهما عند مستوى ثقة 95%.

الجدول (3). التحليل الاحصائي باستعمال اختبار توكي متعدد المقارنات Tukey's multiple comparisons test لبيان الدلالة المعنوية عند مقارنة قيم IC_{50} بين العزلات الأربعة

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
L1 vs. L2	-0.003637	-0.008362 to 0.001088	No	ns	0.1412
L1 vs. L3	0.02022	0.01549 to 0.02494	Yes	****	<0.0001
L1 vs. L4	0.01086	0.006135 to 0.01559	Yes	***	0.0004
L2 vs. L3	0.02385	0.01913 to 0.02858	Yes	****	<0.0001
L2 vs. L4	0.01450	0.009772 to 0.01922	Yes	****	<0.0001
L3 vs. L4	-0.009357	-0.01408 to -0.004632	Yes	**	0.0010

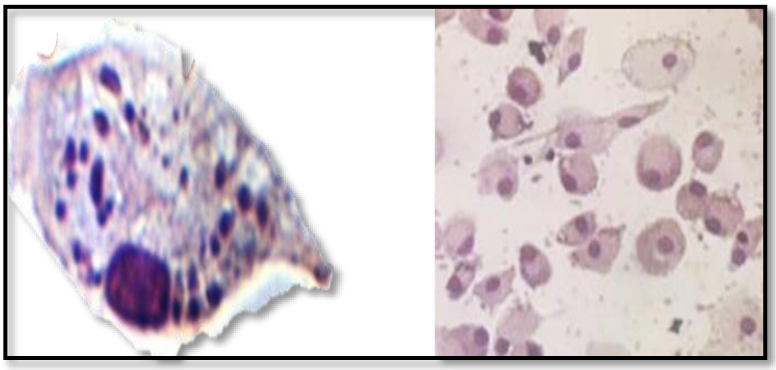
عند مقارنة حساسية العزلات الأربعة لمركب أمفوتريسين B كان ترتيب العزلات من الأقل حساسية (الأعلى مقاومة) إلى الأعلى حساسية (الأقل مقاومة) وفق التسلسل التالي L2 >L1> L4 > L3 كما يظهر الشكل (3).



الشكل (3). مخطط مقارنة بين العزلات الأربعة يوضح ترتيبها من حيث درجة الحساسية لمركب أمفوتريسين B بالاعتماد على قيم IC50،
*: تمثل وجود فرق معنوي إحصائي، ns: تمثل عدم وجود فرق معنوي إحصائي.

2.3. حساب قدرة الأشكال أمامية السوط على خمج البلاعم البشرية ونسبة الحمل الطفيلي:

بعد استكمال تمايز البلاعم البشرية وخمجها بالأشكال أمامية السوط من طفيلي اللشمانيا، حضنت لمدة 24 ساعة ومن ثم ثبتت ولونت الآبار بملون غيمزا، كما يظهر في الشكل (4).



B A

الشكل (4). البالعات الكبيرة البشرية، التكبير 40X.

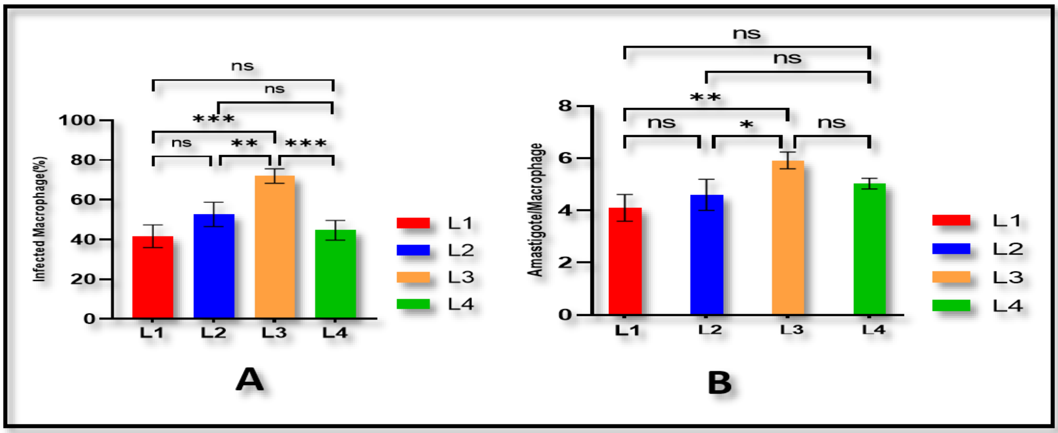
A: بلاعم غير مخمجة بعد اكتمال تمايزها في اليوم التاسع من زراعتها. B: بلاعم مخمجة بطفيلي اللشمانيا حيث تظهر داخلها الأشكال داخلية السوط

تم فحص 100 بالعة بالمجهر المقلوب على تكبير 40X وجاءت نتائج القدرة الإخماجية (نسبة البلاعم المخمجة %) والحمل الطفيلي لكل عزلة من العزلات الأربع كما هو موضح في الجدول (4).

الجدول(4) . يبين الجدول القدرة الإخماجية ونسبة الحمل الطفيلي لكل عزلة من العزلات الأربعة

Isolate	Infected Macrophages %	Amastigotes/Macrophage
L1	41.66±5.68	4.10±0.50
L2	52.66±6.11	4.59±0.59
L3	72.00±3.60	5.91±0.31
L4	44.66±4.93	5.02±0.20

لدى المقارنة إحصائياً بين العزلات الأربعة من حيث القدرة الإخماجية الشكل (5-A) نلاحظ وجود فروق معنوية بين مثنويات العزلات الاتية : (L3,L4) و(L3,L2) و(L3,L1) بينما لم تظهر أي فروق معنوية في المثنويات التالية: (L1,L4) و(L1,L2) و(L2,L4) . أما عند مقارنة نسب الحمل الطفيلي الشكل (5-B) لوحظ وجود فروق معنوية بين المثنويات التالية (L1,L3) و(L2,L3) بينما لم تظهر باقي المثنويات أي فروق معنوية عند مستوى ثقة 95%.



الشكل (5). مخطط مقارنة يوضح الاختلافات بين العزلات الأربعة من حيث القدرة الإخماجية (A)، ونسب الحمل الطفيلي (B).

***: تمثل وجود فرق معنوي إحصائي، ns: تمثل عدم وجود فرق معنوي إحصائي.**

4. المناقشة:

يُعد العلاج الكيميائي إجراء حاسم وأساسي في السيطرة على داء اللشمانيات، وذلك في غياب اللقاح المناسب (Brandonisio & Spinelli, 2002)، وعلى الرغم من الانتشار الواسع لهذا الداء حول العالم إلا أن الأصناف الدوائية المستخدمة في تدبيره ما زالت محدودة، وقد اعتُمدت مركبات الأنتيموان خماسية التكافؤ كخط أول في علاج داء اللشمانيات لأكثر من 80 عاماً (Sundar & Goyal, 2007) حيث تستخدم بمفردها أو بالمشاركة مع أدوية الخط الثاني مثل مركب أمفوتريسين B (Amp B)، وقد سُجّل استخدام الأخير بشكل متزايد في علاج الحالات الناكسة أو غير النمطية كما أنه طبق بشكل واسع لعلاج داء اللشمانيات في بعض دول العالم مثل تايلند (Phumee *et al.*, 2020)، كما تواجه الجوانب العلاجية لجميع هذه الأدوية منذ سنوات تحديات كبيرة بسبب المقاومة السريرية التي ظهرت في جميع أنحاء العالم، ولم تعد النتائج العلاجية عند تطبيق هذه الأدوية مثالية كما كانت سابقاً (Salari *et al.*, 2022)، إذ بيّنت العديد من الدراسات أن جينوم طفيلي اللشمانيا يتمتع بدرجة عالية من اللدونة تمكنه من تطوير سلالات تنتمي للنوع نفسه إلا أنها تعطي أنماطاً ظاهرية مختلفة وبالتالي فإن تصنيف الأنواع بين حساسة أو مقاومة للدواء فقط هو مفهوم غير دقيق، إذ من الممكن أن تتفاوت درجة الحساسية الدوائية بين العزلات التابعة للنوع الواحد حتى وإن كانت ضمن نفس المنطقة الجغرافية (Sundar *et al*,. 2000; Hadighi *et al.*,2007; Laffitte *et al.*,2016; Sasidharan & Saudagar, 2021)، حيث ظهر هذا التفاوت في درجة الحساسية الدوائية عند مقارنة قيم IC_{50} بين العزلات المحلية الأربعة تجاه مركب (Amp B)، إذ أعطت معظم المقارنات (بين كل عزلتين على حدة) فروقات ذات دلالة معنوية ($P \leq 0.001$) باستثناء العزلتين (L1,L2) حيث لم تكن الفروق معنوية بينهما ($P = 0.1412$)، كما أن التأثير المثبط لمركب (Amp B) على العزلات المختلفة كان متغايراً إلى حد ما، حيث كان الفرق في قيم IC_{50} بين العزلة L2 الأكثر مقاومة والعزلة L3 الأقل مقاومة (L2 IC50 / L3 IC50) بحدود 1.42 ضعفاً، وهي نسبة لا يمكن تجاهلها على اعتبار أن العزلات جميعها تنتمي إلى النوع نفسه *L. tropica* ومعزولة من مرضى غير معالجين سابقاً بمركب (Amp B)، مما يعزز احتمال وجود تنوع في الأنماط الظاهرية بين العزلات المحلية من حيث درجة الحساسية الدوائية تجاه مركب Amp B والتي يمكن إرجاعها إلى مجموعة من الأسباب وفي مقدمتها اختلاف درجة السيولة الغشائية Membrane Fluidityلطفيليات كل عزلة من العزلات الأربعة، كون الألفة العالية لمركب (Amp B) تجاه الغشاء الخلوي للطفيلي تحتاج إلى سيولة غشائية منخفضة وهو أمر منوط باصطناع الأرغسترول، وبالتالي فإن أي تغيير يطرأ على هذا المسار قد يؤدي بطريقة ما إلى استبدال الأرغسترول بشكل آخر أقل ألفة لمركب (Amp B) كما هو الحال مع مركب الستيرول cholesta-5,7,24-trien-3β-ol الذي يعمل على زيادة السيولة الغشائية وبالتالي زيادة درجة مقاومة الطفيلي (Mbongo *et al.*, 1998)، وفي منحى آخر أشارت دراسة أجريت على اللشمانيا الدونوفانية *L. donovani* إلى الدور الذي تؤديه عائلة ATP-binding cassette (ABC) المسؤولة عن عزل الأدوية ودفقها إلى خارج الطفيلي حيث ربطت بين زيادة التعبير عن جين Multi-Drug Resistance 1 (MDR1) وخفض درجة الحساسية الدوائية لمركب Amp B (Purkait *et al.*, 2012)، حيث يعد MDR1 أحد أهم الجينات التي يزداد التعبير عنها في السلالات المقاومة لمركبات الأنتيموان خماسية التكافؤ (Ashutosh *et al.*, 2007; Decuypere *et al.*, 2005; Jeddi *et al.*, 2011; Abadi *et al.*, 2021). وعلى اعتبار أن تطبيق مركب (Amp B) على المرضى المصابين بداء اللشمانيات في الجمهورية العربية السورية محدود جداً فإن فرصة تشكليه لضغط اصطفائي على طفيليات الليشمانيا المحلية وتطويرها مقاومة نوعية تجاهه هو أمر ضعيف لذا يرجّح أن إظهار العزلات المحلية التي تم اختبارها في هذه الدراسة لدرجات مختلفة من الحساسية الدوائية تجاه مركب (Am B) جاء بشكل غير مباشر عن طريق تعرّض مصابين سابقين بداء اللشمانيات الجلدي لدورات علاجية غير كاملة أو جرعات دون الحد الأمثل من مركبات الأنتيموان خماسية التكافؤ مما ينتج عنه تعريض طفيلي النوع *L. tropica* لضغط دوائي لفترة زمنية طويلة ضمن الإنسان (المضيف الخازن) (Ait-Oudhi *et al.*, 2011; Ponte-Sucre *et al.*,2017; Al-Nahhas & Kaldas, 2013)، وبالتالي تطوّر هذه العزلات المحلية آليات مقاومة تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية بشكل أساسي ولكنها أيضاً فعالة تجاه مركب (Amp B)، حيث تم تسجيل

ظاهرة المقاومة المتصالبة عند بعض سلالات اللشمانيا لمركب (Amp B) مع أدوية أخرى كمركبات الأنتيموان الخماسية والملتيفوسين. (de Moura *et al., 2016*; Fairlamb *et al.*, 2016; Fernandez-Prada *et al.*, 2016; Shaw *et al.*, 2016).

يُعدّ التركيز المثبط للنصف (IC50) المعيار الأساسي لقياس درجة فوعة الطفيلي في المختبر *in vitro* عند تطبيق مركب دوائي ما (Casadevall & Pirofski, 2000)، بينما تدخل قدرة طفيليات اللشمانيا على خمج البلاعم الكبيرة والحمل الطفيلي parasite burden ضمن المعايير المستخدمة لتوصيف نمط حياة الفوعة virulence life-style للسلالات المختلفة وخصوصاً في المراحل الأولى من الإصابة (Wassenaar & Gaastra, 2001)، وضمن هذا التوصيف أبدت العزلة L3 نسبة خمج أعلى للبلاعم مقارنة بالعزلات الأخرى وبفروقات ذات دلالة معنوية ($P \leq 0.01$)، بينما لم تكن الفروقات بين باقي العزلات ذات دلالة معنوية، وبنتائج مماثلة كان مُعدّل الحمل الطفيلي للبلاعم عند خمجها بالعزلة L3 الأعلى بين العزلات الأربعة وبفروقات ذات دلالة معنوية عند مقارنتها بالعزلتين L1 وL2 ($P \leq 0.05$)، وبناءً على ما سبق يمكن وصف نمط فوعة العزلة L3 بالنمط الأكثر قدرة على خمج البلاعم والتواجد داخلها بأعداد كبيرة، في حين أن العزلة نفسها– L3 – أبدت درجة مقاومة أقل تجاه مركب Amp B وبالتالي مستوى فوعة أقل مقارنة بالعزلات الأخرى، وهو أمر يمكن تفسيره من خلال ميل الأشكال أمامية السوط للسلالات الأكثر فوعة (الأعلى مقاومة) إلى الارتباط بنوع واحد من المستقبلات (CR3) مما يضمن لها عدم تنشيط البالعات (Aderem & Undehill, 1999; Sehgal *et al.*, 1993)، حيث تتجنب الارتباط بالمستقبلات الأخرى مثل مستقبلات (MFR) لتفادي تفعيل الاستجابة الالتهابية Inflammatory Responses(Linehan *et al.*, 2000)، في حين تلجأ السلالات قليلة الفوعة (الأقل مقاومة) إلى الارتباط بأنواع متعددة من المستقبلات (MFR,CR3) على سطح البالعات (Sehgal *et al.*, 1993) وبالتالي تصبح احتمالية تآثر طفيلي– بالعة أكبر مما يزيد من فرصة ارتباط أعداد أكبر من طفيلي اللشمانيا ودخولها إلى عدد أكبر من البلاعم وبالتالي قدرة إخماجية أعلى وحمل طفيلي أكبر مقارنة بالسلالات الأكثر فوعة، حيث تجدر الإشارة إلى أنه في بعض حالات داء اللشمانيات ليس بالضرورة أن ترتبط شدة المرض وفوعته بزيادة الحمل الطفيلي parasite burden (Goto & Mizobuchi, 2023) مع ملاحظة أن أعداد الطفيليات ضمن البالعة (الحمل الطفيلي) خلال زمن التجربة (24 ساعة) لم ينتج عن تكاثر الأشكال داخلية السوط كونها تبدي معدل نمو أبطأ مقارنة بالأشكال أمامية السوط، ولا تلجأ في الفترة الأولى من الخمج إلى التضاعف ضمن البلاعم بل إلى تعزيز فرص بقائها داخل الفجوة البلعمية(Sunter & Gull, 2017; Yasmin *et al.*, 2022) ومقاومة الإجهادات الحرارية وتغيرات درجة PH من خلال زيادة التعبير عن بروتينات الصدمة الحرارية HSPs والبروتينات التي تساعد في عملية التحول من الشكل أمامي السوط إلى الشكل داخلي السوط وتعزيز إنتاج العديد من الأنزيمات المقاومة للآليات الدفاعية عند البلاعم مثل أنزيم سيستين بروتياز cysteine proteinases، وأنزيمات الفوسفاتاز phosphatases (Bifeld & Clos, 2015; Gupta *et al.*, 2022; Soulat & Bogdan, 2017; Sutter *et al.*, 2017)

أظهرت نتائج دراستنا وجود اختلافات بين العزلات المحلية التابعة للنوع *L. tropica* والمسببة للداء الجلدي من حيث القدرة الإخماجية ودرجة الحساسية الدوائية لمركب (Amp B)، كما أشارت إلى كون العزلة الأقل مقاومة لمركب (Amp B) أبدت قدرة إخماجية أعلى للبلاعم في المختبر *in vitro*.

5. الاستنتاجات:

- وجود فروق واضحة في درجة الحساسية الدوائية بين العزلات المحلية التابعة للنوع *L. tropica* تجاه مركب أمفوتريسين B.
- أظهرت العزلة الأقل مقاومة لمركب أمفوتريسين B قدرة إخماجية أعلى للبلاعم وحمل طفيلي أكبر.

6. المراجع:

1. Abadi, M. F. S., Moradabadi, A., Vahidi, R., *et al.* (2021). High resolution melting analysis and detection of *Leishmania* resistance: the role of multi drug resistance 1 gene. *Genes and Environment, 43*, 1-8 .
2. Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology, 17*(1), 593-623 .
3. 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 .
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. Bifeld, E., & Clos, J. (2015). The genetics of *Leishmania* virulence. *Medical microbiology and immunology, 204*, 619-634 .
7. Brandonisio, O., & Spinelli, R. (2002). Immune response to parasitic infections-an introduction. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders, 2*(3), 193-199 .
8. Casadevall, A., & Pirofski, L.-a. (2000). Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and immunity, 68*(12), 6511-6518 .
9. Chakraborty, R., Chakraborty, P., & Basu, M. K. (1998). Macrophage mannosyl fucosyl receptor: its role in invasion of virulent and avirulent *L. donovani* promastigotes. *Bioscience Reports, 18*, 129-142 .
10. 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 .
11. Chattopadhyay, A., & Jafurulla, M. (2011). A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochemical and biophysical research communications, 416*(1-2), 7-12 .
12. de Moura, T. R., Santos, M. L. B., Braz, J. M., *et al.* (2016). Cross-resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. *Parasitology research, 115*, 713-721 .
13. 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.
14. Fairlamb, A. H., Gow, N. A., Matthews, K. R., *et al.* (2016). Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nature microbiology, 1*(7), 1-15 .
15. Fernandez-Prada, C., Vincent, I. M., Brotherton, M.-C., *et al.* (2016). Different mutations in a P-type ATPase transporter in *Leishmania* parasites are associated with cross-resistance to two leading drugs by distinct mechanisms. *PLoS neglected tropical diseases, 10*(12), e0005171 .
16. Giorgio, S., Santos, M. R. M., Straus, A. H., *et al.* (2003). Effect of glycosphingolipids purified from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes on human peripheral lymphocytes. *Clinical and Vaccine Immunology, 10*(3), 469-472 .
17. Giorgione, J. R., Turco, S. J., & Epand, R. M. (1996). Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from Leishmania donovani. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 93*(21), 11634-11639 .
18. Goto, Y., & Mizobuchi, H. (2023). Pathological roles of macrophages in *Leishmania* infections. *Parasitology International*, 1 .02738
19. Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., *et al.* (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 109*(7), 2234-2239 .
20. Gupta, A. K., Das, S., Kamran, M., *et al.* (2022). The pathogenicity and virulence of *Leishmania*-interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence, 13*(1), 903-935 .
21. 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 .
22. 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 .

23. Jeddi, F., Piarroux, R., & Mary, C. (2011). Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. *Journal of tropical medicine, 2011* .
24. Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2000). *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current opinion in hematology, 7*(1),26-31.
25. Khosravi, A., Sharifi, I., Tavakkoli, H., *et al.* (2022). Cytotoxicity of amphotericin B and AmBisome: In silico and in vivo evaluation employing the chick embryo model. *Frontiers in Pharmacology, 13,* 860598 .
26. Kumar, A., Das, S., Purkait, B., *et al.* (2014). Ascorbate peroxidase, a key molecule regulating amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 58*(10), 6172-6184 .
27. Laffitte, M.-C. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., *et al.* (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Research, 5* .
28. Linehan, S. A., Martinez-Pomares, L., & Gordon, S. (2000). Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms*, 1-14 .
29. Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology, 2*, 83 .
30. Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., *et al.* (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in Candida albicans. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 49*(6), 2226-2236 .
31. Marchesini, N., & Docampo, R. (2002). A plasma membrane P-type H+-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana* amazonensis. *Molecular and biochemical parasitology, 119*(2), 225-236 .
32. Mbongo, N., Loiseau, P. M., Billion, M. A., *et al.* (1998). Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 42*(2), 352-357 .
33. Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., & Zaragoza, O. (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology, 3*, 286 .
34. Mosimann, V., Neumayr, A., Paris, D. H., *et al.* (2018). Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. *Acta tropica, 182,* 246-250 .
35. Mosser, D., & Brittingham, A. (1997). Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology, 115*(7), 9-23 .
36. Naderer, T., & McConville, M. J. (2008). The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology, 10*(2), 301-308 .
37. Phumee, A., Jariyapan, N., Chusri, S., *et al.* (2020). Determination of anti-leishmanial drugs efficacy against *Leishmania* martiniquensis using a colorimetric assay. *Parasite epidemiology and control, 9,* e00143 .
38. 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 .
39. Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., *et al.* (2012). Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 56*(2), 1031-1041 .
40. Rizvi, F. S., Ouaissi, M. A., Marty, B., *et al.* (1988). The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *European journal of immunology, 18*(3), 473-476 .
41. 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 .
42. Russell, D. G., & Wright, S. (1988). Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *The Journal of experimental medicine, 168*(1), 279-292 .
43. Salari, S., Bamorovat, M., Sharifi, I., *et al.* (2022). Global distribution of treatment resistance gene markers for leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis, 36*(8), e24599 .
44. Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitology research, 120,* 1541-1554 .
45. Sehgal, G., Zhang, K., Todd 3rd, R., *et al.* (1993). Lectin-like inhibition of immune complex receptor-mediated stimulation of neutrophils. Effects on cytosolic calcium release and superoxide production. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 150*(10), 4571-4580 .

46. Shaw, C., Lonchamp, J., Downing, T., *et al.* (2016). In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: genomic and metabolomic characterization. *Molecular Microbiology, 99*(6), 1134-1148 .
47. Singh, O. P., Tiwary, P., Kushwaha, A. K., *et al.* (2021). Xenodiagnosis to evaluate the infectiousness of humans to sandflies in an area endemic for visceral leishmaniasis in Bihar, India: a transmission-dynamics study. *The Lancet Microbe, 2*(1), e23-e31 .
48. Soulat, D., & Bogdan, C. (2017). Function of macrophage and parasite phosphatases in leishmaniasis. *Frontiers in immunology, 8*, 1838 .
49. 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 .
50. Sundar, S., & Goyal, N. (2007). Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of medical microbiology, 56*(2), 143-153 .
51. 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 .
52. Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology, 7*(9), 170165 .
53. Sutter, A., Antunes, D., Silva-Almeida, M., *et al.* (2017). Structural insights into leishmanolysins encoded on chromosome 10 of Leishmania (Viannia) braziliensis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 112*, 617-625 .
54. Tiwari, N., Kumar, A., Singh, A. K., *et al.* (2019). Leishmaniasis control: Limitations of current drugs and prospects of natural products *Discovery and development of therapeutics from natural products against neglected tropical diseases* (pp. 293-350): Elsevier.
55. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., *et al.* (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research, 6* .
56. Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology, 64*, 665-700 .
57. Wassenaar, T. M., & Gaastra, W. (2001). Bacterial virulence: can we draw the line ؟*FEMS microbiology letters, 201*(1), 1-7 .
58. Wortmann, G., Zapor, M., Ressner, R., *et al.* (2010). Lipsosomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 83*(5), 1028 .
59. Yasmin, H., Adhikary, A ،.Al-Ahdal, M. N., *et al.* (2022). Host–pathogen interaction in leishmaniasis: immune response and vaccination strategies. *Immuno, 2*(1), 218-254 .