

تقييم حساسية عزلات محلية من طفيلي اللشمانيا المدارية *L. tropica* داخل البلاعم تجاه البنتوستام (*Ex vivo*) ودراسة التعبير عن عدد من جينات المقاومة

مؤيد يزبك مرعي¹ شادي الياس سكرية² محمود الأخضر قويدر³

1 طالب دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، جامعة دمشق -

merieel.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:

يُعدُّ داء اللشمانيات الجلدي البشري (Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) مرضاً مستوطناً في معظم المحافظات السورية، وينتج بشكل رئيس عن الإصابة بطفيلي اللشمانيا *Leishmania* من النوع *L. tropica*. إن الاستخدام طويل الأمد لمركبات الأنتيمون الخماسية Sb(V) في تدبير هذا الداء أدى إلى تطور سلالات محلية ذات أنماط ظاهرية مختلفة من حيث درجة الحساسية الدوائية، لذا هدف هذا البحث إلى تقييم درجة الحساسية الدوائية للأشكال داخلية السوط Amastigote لعزلات محلية من النوع *L. tropica* تجاه دواء البنتوستام، ودراسة التعبير الجيني لكل من جينات المقاومة المحتملة التالية: GSH1 وMRPA وAQP1 وTryR وPgp A. تم في هذا العمل عزل وحيدات النوى من الدم المحيطي البشري وزراعتها ضمن أوساط استنبات خاصة حتى استكمال تمايزها إلى بلاعم ثم أُخمدت بالأشكال أمامية السوط Promastigote العائدة لأربع عزلات محلية (L4 - L1) من النوع *L. tropica* ثم عولجت هذه البلاعم المُخمجة بثلاث تراكيز متدرجة من مركب البنتوستام لمدة 24 ساعة، بعدها حُدد الحمل الطفيلي من الأشكال داخلية السوط داخل البلاعم المُخمجة وحسبت قيمة الجرعة المثبطة للنصف لكل عزلة من العزلات الأربعة. عُزل الـ RNA الكلي من الأشكال داخلية السوط المحولة بالحرارة وحُوّل إلى cDNA ودُرس التعبير النسبي عن جينات المقاومة باستعمال تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز الكمي في الزمن الحقيقي RT-qPCR. أظهرت النتائج وجود فروق معنوية في قيم الـ IC50 بين العزلات الأربعة وفق الترتيب التالية (L3>L2>L4>L1) مع تباين واضح في التأثير المثبط للبنتوستام والذي كان بحدود (1.7) ضعفاً بين العزلة الأكثر مقاومة L3 والعزلة الأقل مقاومة L1. لم تظهر العزلات الأربعة أي اختلافات معنوية في قيم التعبير النسبي عن الجينات MRPA وAQP1، بينما أظهرت العزلة L3 فقط زيادة معنوية عن باقي العزلات بالنسبة لجين Pgp A. كما أبدت جميع العزلات فروقاً معنوية فيما بينها بالنسبة للجين GSH1 باستثناء المثوية (L1, L4) مع وجود علاقة ارتباط قوية ($r = 0.98$) تجمع بين ارتفاع التعبير النسبي عن هذا الجين وزيادة قيم IC50 بين العزلات، وأيضاً أظهرت العزلات الأربعة فروقاً معنوية بالنسبة للتعبير عن جين TRYR باستثناء المثويتين (L1, L4) و(L2, L4) وارتبط ارتفاع التعبير عن

تاريخ الإيداع: 2024/07/10

تاريخ القبول: 2024/08/08



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

جين TRYR بزيادة قيم IC50 بين العزلات. خلُصت هذه الدراسة إلى أنّ العزلات المحلية من النوع *L. tropica* تُظهر درجات مختلفة من الحساسية الدوائية تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية، وترتبط هذه الفروقات بآليات جينية منها زيادة التعبير عن الجينات GSH1 و TryR في العزلات الأكثر مقاومة، بينما يتطلب تحديد الدور المحتمل لزيادة التعبير عن جين Pgp A القيام بالمزيد من الدراسات والتحري. تُقدم هذه النتائج معلومات قيّمة لفهم ديناميكيات مقاومة الأدوية في داء الشمانيات الجلدي البشري، وتؤكد على ضرورة تطوير علاجات نوعية تستهدف مسارات المقاومة الخاصة بالعزلات المحلية.

الكلمات المفتاحية: داء الشمانيات الجلدي البشري، الشمانيا المدارية، مركبات الأنتيموان الخماسية، البنتوستام، الأشكال داخلية السوط، جينات المقاومة.

Evaluation of the Sensitivity of Locally Isolated *L. tropica* in Macrophages to Pentostam (*Ex vivo*) and Study the Expression of the Resistant Genes

Mouayad Yzbek Meriee^{1*}, Chadi Elias Soukkarieh,²
Mahmoud Al-Akhdar Kweider³

⁽¹⁾ PhD Student, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria merieel.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:

Anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL), an endemic disease in Syria, is mainly caused by *Leishmania tropica*. Long-term use of pentavalent antimony (Sb(V)) compounds for CL treatment has led to the emergence of locally strains with varying drug sensitivity patterns. This study aimed to evaluate the drug susceptibility of local *L. tropica* isolates to pentostam and investigate the gene expression of GSH1, MRPA, AQP1, TryR, and PgpA, potential resistant genes. This study was conducted with monocytes isolated from human peripheral blood. These monocytes were then differentiated into macrophages and infected with promastigotes of four local *L. tropica* isolates (L1-L4). Infected macrophages were treated with three different concentrations of pentostam for 24 hours. Subsequently, the amastigote burden and IC50 values of pentostam were determined for each isolate. Total RNA was extracted from heat-transformed amastigotes and reverse-transcribed into cDNA. Relative gene expression of resistance genes was assessed using RT-qPCR. Our results showed significant differences in IC50 values among the isolates (L3 > L2 > L4 > L1), with a 1.7-fold difference in the inhibitory effect of pentostam between the most resistant (L3) and least resistant (L1) isolates. No significant differences in MRPA and AQP1 expression were observed. Only isolate L3 showed a significant increase in PgpA expression compared to other isolates. All isolates exhibited significant differences in GSH1 expression except for the L1/L4 pair. A strong positive correlation ($r = 0.98$) was found between GSH1 expression and IC50 values. Significant differences in TryR expression were also observed among the isolates, except for the L1/L4 and L2/L4 pairs. Increased TryR expression was associated with higher IC50 values. This study demonstrates that local *L. tropica* isolates exhibit varying degrees of susceptibility to antimony pentavalent compounds, associated with differential gene expression, particularly upregulation of GSH1 and TryR in more resistant isolates. Further studies are needed to elucidate the role of PgpA overexpression. These findings provide valuable insights into drug resistance dynamics in CL and highlight the need for developing targeted therapies against local isolate-specific resistance mechanisms.

Key words: Anthroponotic Cutaneous leishmaniasis, *L. tropica*, pentavalent antimony, pentostam, amastigote, Resistant genes.

Received: 10/07/2024

Accepted: 08/08/2024



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

1. المقدمة:

يُعدّ داء اللشمانيات Leishmaniasis واحداً من أكثر الأمراض الطفيلية انتشاراً على مستوى العالم (Knight, Harris et al. 2023)، حيث يسجل سنوياً أكثر من مليون إصابة جديدة تتوزع على 90 دولة في جميع القارات باستثناء أستراليا والقارة القطبية الجنوبية، مع تركز ملحوظ لهذه الإصابات في المناطق المدارية وشبه المدارية (Inceboz 2019).

ينتج داء اللشمانيات عن الإصابة بطفيلي وحيد خلية من جنس اللشمانيا *Leishmania*، تنقله إلى الإنسان أنثى ذبابة الرمل *Sand fly*. يتعاقب على دورة حياة هذا الطفيلي شكلان إغاشيان أحدهما متحرك أمامي السوط Promastigote ينمو وينقسم داخل الناقل اللافقاري، يتحول بعدها إلى شكل غير متحرك داخلي السوط Amastigote يتضاعف ضمن بلاعم Macrophages المضيف الفقاري (Gossage, Rogers et al. 2003).

تتنوع التظاهرات السريرية لداء اللشمانيات بشكل كبير بحسب نوع الطفيلي المسبب للداء ونوع النسيج المستهدف (Akhoundi, Downing et al. 2017)، ويمكن تصنيفها إلى ثلاثة أشكال رئيسية هي داء اللشمانيات الجلدي (Cutaneous Leishmaniasis (CL) وداء اللشمانيات المخاطي (Muco Cutaneous Leishmaniasis (MCL) وداء اللشمانيات الحشوي (Visceral Leishmaniasis (VL) (David and Craft 2009)، ويُعدّ داء اللشمانيات الجلدي البشري (Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) الشكل الأكثر انتشاراً وتوطناً في الجمهورية العربية السورية، وينتج عن الإصابة بالنوع *L. tropica* (Tayeh, Jalouk et al. 1997, Ghatee, Taylor et al. 2020)، حيث تظهر الآفات الجلدية على شكل تقرحات غير مؤلمة قد تترك ندبات دائمة (Dowlati 1996).

يعتمد تدبير داء اللشمانيات على عدد قليل من الزمر الدوائية، أهمها مركبات الأنتيموان خماسية التكافؤ Pentavalent Antimonials Sb(V) بشكليها الدوائيين الغلوكانتيم (Glucantime®) والبنستام (Pentostam®)، والتي تستخدم منذ عام 1940م كخط أول في علاج داء اللشمانيات (Uliana, Trinconi et al. 2018)، حيث تعمل هذه المركبات وفق حركية دوائية يتم فيها اختزال الشكل الخماسي Sb(V) إلى الشكل الثلاثي Sb(III) **إما ضمن خلايا المضيف** حيث يتم قبضه من قبل الطفيلي عبر نمط خاص من القنوات البروتينية aquaglyceroporin (AQP1)، أو **داخل الطفيلي** حيث يشكل معقدات مستقرة مع الثيولات Thiol-Sb(III) خصوصاً مع التريبانوثيون Trypanothione (T(SH)₂) والغلوتاثيون glutathione (GSH) مما يستنزف مخزون الثيولات داخل الطفيلي (Wyllie, Cunningham et al. 2004, Jeddi, Piarroux et al. 2011). كما يرتبط Sb(III) مع الموقع الفعال لإنزيم اختزال التريبانوثيون Trypanothione reductase (TryR) مما يؤدي إلى تثبيط عملية تحويل ثنائي كبريتيد التريبانوثيون المؤكسد (T(S₂)) إلى ثنائي ثيول التريبانوثيون المختزل (T(SH)₂)، حيث يعتبر الأخير مضاد أكسدة فعال يرتبط مع بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) وجذور الهيدروكسيل (OH) (Frézard, Monte-Neto et al. 2014, Beig, Oellien et al. 2015)، جميع الأحداث السابقة تعمل على رفع مستويات مركبات الأكسجين التفاعلية Reactive Oxygen Species (ROS) داخل الطفيلي وتزيد من حساسيته للإجهاد التأكسدي، وبالتالي إحداث ضرر كبير في الحموض النووية والبروتينات والغشاء البلازمي للطفيلي (Frézard, Demicheli et al. 2009). كما يعمل Sb(III) على تعطيل مسار التحلل السكري Glycolysis وتثبيط اصطناع الأحماض الدهنية fatty acid synthesis (Herman, Gallalee et al. 1987). أيضاً يزيح Sb(III) أيون الزنك Zn(II) في عامل الانتساخ إصبع الزنك-zinc-finger transcription factor ويحل مكانه محدثاً عدم استقرار بنيوي وخللاً في تنظيم التعبير الجيني لعدد من جينات عائلة الكاسبازات (Caspases) مما يقود إلى تحريض عملية استموات الطفيلي (apoptosis) (Laity, Lee et al. 2001, Frézard, Demicheli et al. 2009, Bhandari, Guha et al. 2011)، يضاف إلى ذلك الدور المباشر للشكل Sb(V) غير المختزل داخل الطفيلي من خلال ارتباطه مع النكليوزيدات الريبية من نمط البيورينات وتثبيط ناقلاتها وتكوينه لمعقدات SbV-purine شديدة السمية (Ferreira, Rocha et al. 2010)، كما يقوم بتثبيط إنزيم DNA topoisomerase type I وإحداث خلل في عملية تضاعف الحمض الريبوي النووي منقوص الأكسجين DNA (Frézard, Demicheli et al. 2009).

إن الاستخدام طويل الأمد لمركبات الأنتيموان الخماسية بصورة غير مضبوطة كتلقي المرضى لجرعات دوائية غير مدروسة أو الانقطاع عن العلاج قبل حدوث الشفاء التام (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017)، مهّد الطريق أمام طفيليات الشمانيا لتطوير مقاومة تدريجية تجاه هذه الأدوية نتيجة تعرضها لضغط اصطفائي مستمر خصوصاً في الأنواع التي تعتمد على البشر كخازن لها مثل النوع *L. tropica* (Aït-Oudhia, Gazanion et al. 2011)، حيث يتمتع جينوم الشمانيا بدرجة عالية من اللدونة تمكنه من إجراء تعديلات على المستويين الجينومي genomic وفوق الجيني Epigenetics بطريقة تضمن للطفيلي تقليل الأثر السمي الناتج عن المركب الدوائي، إذ تقوم طفيليات الشمانيا بمعاوضة الأنزيمات المستهدفة من قبل مركبات الأنتيموان الخماسية (Beverley, Ellenberger et al. 1991, Borst and Ouellette 1995, Croft, Sundar et al. 2006) بالإضافة إلى التحكم بآليات قبض المركب المعدني Uptake وعزله Sequestration وطرده خارج الطفيلي Efflux (Madusanka, Karunaweera et al. 2024). وبالتالي فإن انخفاض التعبير عن البروتينات القنوية من النمط AQP1 ينقص تركيز Sb(III) داخل الطفيلي وهو ما يعدّ ميزة هامة عند السلالات المقاومة (Marquis, Gourbal et al. 2005)، بالمقابل يلجأ طفيلي الشمانيا خلال مراحل تطوره للمقاومة الدوائية إلى زيادة التعبير عن البروتينات والنواقل المسؤولة عن عزل وضخ الدواء إلى خارج الطفيلي من خلال تكرار الجينات المرمزة لها خارج الصبغي فيما يعرف بالتضخيم الجيني Gene amplification أو عن طريق تكرار بعض الصبغيات مما يؤدي إلى اختلال الصيغة الصبغية Aneuploidy (Beverley, Ellenberger et al. 1991, Borst and Ouellette 1995)، حيث أكدت عدة دراسات أن زيادة التعبير عن جين المقاومة الدوائية المرتبطة بالبروتين Multi-drug Resistance related Protein A (MRPA A or ABC3) يسرّع عملية عزل وتغليف معقدات Thiol-Sb(III) ضمن الحويصلات داخل الخلية intracellular vesicles ويمنع وصولها إلى أهدافها الجزيئية داخل الطفيلي، تمهيداً لطردها وفق مسار إخراج خلوي exocytosis (El Fadili, Messier et al. 2019). بالإضافة إلى ذلك فإن إجراء طفيلي الشمانيا لتعديلات على المسارات الاستقلابية من خلال تحفيز إنتاج أنزيم Gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) المسؤول عن الخطوة الأولى المحددة لمعدل اصطناع ثيول الغلوتاتيون (GSH) وبالتالي فرط إنتاج ثيول التريبانوثيون (Madusanka, Karunaweera et al. 2024)، بالإضافة إلى تحفيز إنتاج أنزيم (TryR) المسؤول عن تحويل التريبانوثيون إلى الشكل المختزل (T(SH2)) يرفع من مستوى الثيولات المضادة للأكسدة ويعزز الآليات الدفاعية المضادة للإجهاد التأكسدي (Zabala-Peñañiel, Dias-Lopes et al. 2023).

أهمية البحث وأهدافه:

إنّ الانتشار الواسع لداء الشمانيات الجلدي البشري في الجمهورية العربية السورية، بالإضافة إلى انخفاض جودة الخدمات الصحية المقدمة خلال سنوات الأزمة والاعتماد بشكل رئيس على مركبات الأنتيموان الخماسية في علاج هذا الداء لفترة زمنية طويلة، أدى إلى تسجيل تباين واضح في نتائج البرتوكولات العلاجية المطبقة ومدى فعاليتها لدى المرضى المعالجين بهذه الزمرة الدوائية، الأمر الذي يشير إلى تطور سلالات محلية ذات أنماط ظاهرية مختلفة من حيث درجة المقاومة الدوائية، وبالتالي أصبح من الضروري رصد وجود أي فروقات في درجة الحساسية الدوائية بين العزلات المحلية تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية وتحديد الآليات المسببة لها من خلال تقييم التغيرات على المستوى الجزيئي لعدد من مسارات المقاومة الرئيسية عند طفيلي الشمانيا. وبناءً على ما سبق هدف هذا البحث إلى تعيين درجة الحساسية الدوائية للأشكال داخلية السوط المخمجة للبلاعم البشرية لأربع عزلات محلية من النوع *L. tropica* تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية وتحري مستويات التعبير عن جينات المقاومة γ -GCS و MRPA و AQP1 و TryR و Pgp A .

مواد البحث وطرقه:**1.2. استنبات الطفيلي:**

درست في هذا العمل أربع عزلات محلية من طفيليات اللشمانيا المدارية المستتبته والمنمطة سابقاً في مختبر البحوث (1) بقسم علم الحياة الحيوانية في كلية العلوم بجامعة دمشق، حيث نُقل 2×10^6 طفيلي من وسط N.N.N إلى 5 ml من وسط زرع سائل RPMI-1640 (Sigma) مدعم بـ 10% من مصل البقر الجنيني FBS (Sigma) Fetal Bovine Serum منزوع المتممة بالتسخين، و 0.5 mmol/l من الغلوتامين L-glutamine (Sigma) والمضاف له الصادين الحيويين سترپتومايسين Streptomycin بتركيز 100 µg/ml والبنسلين Penicillin بتركيز 100 unit/ml وحضنت هذه المستنبات الطفيلية في درجة حرارة 26 م مع المراقبة اليومية من حيث العدد والشكل والنشاط بدءاً من بداية الطور اللوغاريتمي Logarithmic Phase حتى الوصول إلى الشكل الممشوق metacyclic promastigote في طور الاستتباب Stationary Phase.

2.2. عزل البلاعم البشرية من الدم المحيطي:

تم عزل الخلايا وحيدات النوى من الدم المحيطي البشري باستخدام مادة الفايكول Histopaque®-1077 (Ficoll) باتباع الخطوات المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة Sigma-Aldrich حيث جُمع (15 ml) من الدم المحيطي البشري ضمن أنابيب تحتوي على مانع تخثر (EDTA) وقُلبت بلطف عدة مرات لمنع تكوّن خثرات دموية، ووضعت الأنابيب بشكل أفقي في حرارة 20 درجة مئوية مع الرج بلطف قبل البدء بعملية الفصل، ومددت العينة الدموية بإضافة حجم مماثل (15 ml) من الدارئة PBS/EDTA. أُضيف المزيج السابق ببضع إلى أنبوب يحوي 15ml من مادة الفايكول (1077)، ثم ثقل الأنبوب السابق وفق الشروط التالية: $800g/30min/RT^{\circ}/acc.1/decc0/$ (في الأعلى) والفايكول (في الأسفل) حيث تم التخلص من القسم الأكبر من البلازما وسحبت الغلالة البيضاء باستخدام الماصة بهدوء تام ونُقلت إلى أنبوب جديد، حيث علقت في 1ml من الدارئة PBS/EDTA ومددت إلى حجم نهائي 40ml من الدارئة نفسها ثم ثقلت وفق الشروط التالية: $400g/15min/RT^{\circ}/acc.5/decc0/$ ، أزيل بعد ذلك السائل الطافي وأضيف 3ml من دارئة حل الكريات الحمراء RBC lysis buffer 1x (NH_4Cl 0.15M- $KHCO_3$ 10Mm-EDTA 0.1Mm) 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: $200g/15min/RT^{\circ}/acc.5/decc5/$ ، بعدها تم التخلص من الطافي وعلقت الرسابة الحاوية على الخلايا في 1ml من الوسط الكامل (IMDM, 10%FBS, Pen/Strep) 1X وتم عد هذه الخلايا باستعمال ملون أزرق التريبان Trypan Blue وحُدّد عدد الخلايا الحية والحجم الذي يجب أخذه لزراعة 5×10^4 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 حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعتين، بعدها تم التخلص من الوسط السابق وغسلت الخلايا بدارئة PBS 1X مرتين لإزالة الخلايا اللمفاوية التي لم تلتصق بسطح الصفيحة وأضيف وسط جديد و أعيدت الصفيحة إلى الحاضنة عند حرارة 37 درجة مئوية 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.

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

بهدف تحديد العدد اللازم إضافته من الأشكال أمامية السوط الممشوقة metacyclic promastigote لتحقيق النسبة 1:5 (طفيلي:بالعة)، ثقل 3ml من المستتبت الطفيلي بسرعة 2900 rpm لمدة 7 min، وتم التخلص من الطافي ثم غسلت الرسابة بدارئة PBS 1X وعلقت بـ 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 عداة Neubauer بهدف تحديد تركيز الطفيلي لكل عذلة 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 حرارة 37 درجة مئوية للسماح لطفيليات اللشمانيا أمامية السوط بدمج البلاعم البشرية، والتحول داخلها إلى الأشكال داخلية السوط amastigote، ثم غسلت بدائرة PBS1X ثلاث مرات للتخلص من الطفيليات التي بقيت خارج البلاعم، بعدها سُحبت دائرة الغسل من جميع الآبار تمهيداً لإضافة وسط الزرع مع المادة الدوائية في الخطوة التالية.

4.2. حساب نسب التثبيط المئوية للأشكال داخلية السوط وتحديد قيم التراكيز المثبطة للنصف IC50

انطلاقاً من الشكل الدوائي بنتوستام (Sodium Stibogluconate, Albert David®) الحاوي على مركب الأنتيموان الخماسي Sb(V) بتركيز 100 mg/ml تم تحضير تدرج التراكيز التالي: 1000 µg/ml - 250 µg/ml - 100 µg/ml عن طريق تخفيفها بحجم مناسب من وسط IMDM الكامل، ثم عولجت آبار كل عذلة من العزلات الأربعة في صفيحة الزرع بـ 100 µl من سلسلة التراكيز السابقة، بواقع مكررين لكل تركيز، مع ترك شاهد غير معالج بـ Sb(V) من كل عذلة (أضيف له 100 µl من وسط IMDM الكامل فقط)، وأعيدت إلى الحاضنة عند حرارة 37 درجة مئوية و5% CO₂.

بعد مرور 24 ساعة ثبتت العينات بالميتانول ثم لونت بملون غيمزا 10% وباستخدام التكبير 40X في المجهر المقلوب تم تسجيل عدد طفيليات اللشمانيا المتواجدة داخل كل بالعة مُمخجة، ثم حُسب معدّل الحمل الطفيلي (عدد الأشكال داخلية السوط/ بالعة) في كل بئر من خلال أخذ المتوسط الحسابي لعدد الطفيليات في 100 بالعة مُمخجة، بعدها حُسبت نسبة التثبيط المئوية لكل تركيز دوائي في كل عذلة من العزلات الأربعة وفق العلاقة التالية:

$$\text{نسبة التثبيط المئوية} = 100 \times \left(\frac{\text{معدل الحمل الطفيلي في العينة المعالجة}}{\text{معدل الحمل الطفيلي في العينة غير المعالجة}} - 1 \right)$$

بالاعتماد على نسب التثبيط المئوية الناتجة تم حساب قيم IC50 في كل عذلة من العزلات الأربعة.

5.2. دراسة التعبير الجيني:

1.5.2. عزل RNA الكلي من الطور داخلي السوط

حضنت أوساط الزرع السائلة الحاوية على الأشكال أمامية السوط الممشوقة metacyclic promastigote في حرارة 37 درجة مئوية، حيث أكملت العزلات الأربعة تمايزها إلى الأشكال داخلية السوط amastigote خلال 72 ساعة، بعدها أخذت حجوم مناسبة من كل وسط زرع للوصول إلى عدد 7×10^7 طفيلي وثقلت على سرعة 3000 rpm لمدة 8 دقائق، ثم أزيل السائل الطافي، وأعيد حل الرسابة الطفيلية بإضافة 1ml من مادة التريزول Trizol (TRI Reagent®, Sigma) حيث تمت مجانسة العينات باستخدام محقن معقم سعة 3ml من خلال سحب العينة وإفراغها عدة مرات بعدها تركت العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة خمس دقائق، ثم أضيف 0.2ml من الكلوروفورم إلى كل عينة وأحكم إغلاقها ثم رجّت جيداً لمدة خمس عشرة ثانية، بعدها حضنت لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، وثُقلت العينات على سرعة 12000 g لمدة 15 دقيقة في حرارة 2 درجة مئوية، نتج عن هذا التنقيط فصل السائل لثلاثة أطوار مختلفة هي طور علوي عديم اللون يحوي على RNA، وطور متوسط يحوي على DNA، بالإضافة إلى طور سفلي أحمر يضم بروتينات الطفيلي المختلفة. نُقل الطور العلوي الحاوي على RNA، إلى أنبوب جديد سعة 1.5ml وأضيف له 0.5ml من الإيزوبروبانول مع المزج جيداً، ثم ترك في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة. بعدها ثقلت الأنبوب على سرعة 12000 g لمدة 10 دقائق في حرارة 2 درجة مئوية، لتتجمع رسابة RNA الكلي البيضاء أسفل وجانب الأنبوب، بعدها تم التخلص من الإيزوبروبانول وغُسلت الرسابة بإضافة 1ml من الإيثانول 70% مع الرج باستخدام المازجة الدوّارة، ثم ثُقلت العينات على سرعة 7500 g لمدة خمس دقائق في حرارة 2 درجة مئوية، تلا ذلك التخلص من الإيثانول 70% باستخدام الماصة وجُففت الرسابة جيداً تحت ساحة الهواء، ثم أضيف لها 50 µl من الماء الخالي من الـ RNase والـ DNase مع المزج المتكرر في حرارة 55 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. ولضمان التخلص من أي بقايا للـ DNA الجينومي عُولجت العينات بأنزيم DNase I (Fermentas, Canada) حيث أضيف لكل عينة 6 µl من أنزيم DNase I مع 6 µl من الدائرة الخاصة بالأنزيم، ثم حُضنت العينات في حرارة 37 درجة مئوية لمدة 30

دقيقة، بعدها أُضيف 6µl من محلول DNase stop solution وحضنت العينات في حرارة 65 درجة مئوية لمدة 10 دقائق وذلك من أجل إيقاف عمل الأنزيم، بعدها حفظت العينات في حرارة (-80) درجة مئوية لحين استخدامها لاحقاً. تم التأكد من جودة RNA المعزول بتقنية الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامه أغاروز بتركيز 1%، وقيست تراكيز الـ RNA الكلي وحددت نقاوتها باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي النانوي Nanodrop 2000.

2.5.2. تحويل mRNA إلى DNA متمم (cDNA)

حولت كمية ثابتة من الـ RNA الكلي من كل عينة إلى DNA متمم (cDNA) باستخدام طقم (GScript First-Strand Synthesis Kit; GeneDirex) حيث تم اتباع تعليمات الشركة المصنعة وفق الخطوات التالية: أخذ حجم مناسب يحوي على كمية 1 ميكروغرام من RNA المعزول وأضيف له 1µl من مرئس عديد التيميدين (dNTP mix بتركيز 10mmol، ثم أكمل الحجم إلى 13µl بإضافة ماء عقيم خالٍ من أنزيمات النكلياز الأوكسيجين بأنماطها الأربعة بتركيز 50 µmol و 1µl من الريبونيكليوتيدات منقوصة الأكسجين بتركيزها الأربعة بتركيز 10mmol، ثم أكمل الحجم إلى 13µl بإضافة ماء عقيم خالٍ من أنزيمات النكلياز وحضن المزيج لمدة 5 دقائق في حرارة 65 درجة مئوية، بعدها ثقل لعدة ثواني ووضع مباشرة على الثلج، ثم أضيف للمزيج السابق 4µl من دائرة التحويل (5X 1st strand buffer) و 1µl من مركب Dithiothreitol (DTT) بتركيز 0.1 mol و 1µl من أنزيم النسخ العكسي GScript RTase بتركيز 200 unite/µl وكمية مناسبة من الماء الخالي من أنزيمات النكلياز للوصول إلى حجم نهائي 20µl، لإنجاز عملية التحويل إلى cDNA حضنت المكونات السابقة لمدة ساعة في حرارة 50 درجة مئوية، بعدها تم إيقاف عمل أنزيم النسخ العكسي عن طريق الحضان لمدة 15 دقيقة في حرارة 70 درجة مئوية، ثم حُفظت نواتج التحويل في المجمدة بدرجة حرارة -20 درجة مئوية لحين استعمالها.

3.5.2. قياس التعبير الجيني بواسطة الاختبار الكمي للتفاعل السلسلي للبوليميراز qRT-PCR

بهدف تحري الاختلافات بين العزلات الأربعة على مستوى التعبير الجيني، طُبّق التفاعل السلسلي للبوليميراز في الزمن الحقيقي (qRT-PCR) على عينات cDNA المُصنّعة باستخدام مرئسات نوعية خاصة بالجينات الهدفية التالية: جين المقاومة الدوائية المتعددة المرتبطة بالبروتين A (MRPA) والجين المرمرزة لمضخة غليكوبروتين A (Pgp A) والجين المرمرزة لقنوات الأكوابورينات من النمط (AQP1) والجين المرمرزة لأنزيم اختزال التريپانوثيون (TryR) وجين GSH1 المرمرزة لأنزيم اصطناع جاما-جلوتاميل سيستئين (γ-GCS)، بالإضافة إلى الجين المرجعية Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (الجدول 1). حيث استعمل طاقم Maxima SYBR qPCR master mix، green/ROX qPCR، Thermo، Lithuania لتحضير حجم نهائي قدره 25µl لكل تفاعل يحوي على 12.5µl من qPCR master mix، 200ng من cDNA، و 0.5µmol لكل من المرئس التّكمي و المرئس العكسي، بالإضافة إلى حجم مناسب من الماء المعقم الخالي من أنزيمات النكلياز. ضُبِطت إعدادات جهاز المدور الحراري الكمي (RT-qPCR، Agilliant Technologies، USA) وفق الشروط التالية: 10 دقائق في 95 م°، 40 دورة (15 ثانية في 95 م°، 30 ثانية في 59 م°، 30 ثانية في 72 م°) و 6 دقائق في 72 م°.

الجدول (1). التسلسلات النيكلوتيدية للمرئسات النوعية المستخدمة في تفاعلات qRT-PCR

نتاج PCR (bp)	التسلسل النيكلوتيدي 5'—3'	المرنس	الجين
101	AGCTCGGTCTACGACTCCAA	GAPDH-F	Reference gene
	GTAGCCCCACTCGTTGTCAT	GAPDH-R	
146	TGGGACTTGTGCTGACTC	MRPA-F	Multi-drug resistance related protein A MRPA(ABCC3)
	CTGCGAAACTGTGAAGCACT	MRPA-R	
159	AATCTTCGCCACATACCCTAAT	AQP1-F	Aquaglyceroporin 1
	ACAAACAACAGTAGTCCAATAGCC	AQP1-R	
173	AGCCCTGCTTTTACACCAAG	GSH-F	Gamma-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS)
	CTTGCCGTTGAAGATCTCGT	GSH-R	
108	GGTCTCATCTCGCTGCTACT	PGPA-F	P-glycoprotein A (LABC14)
	ACGCTCCACGCTGTTCAT	PGPA-R	
157	CATCAACGAGAGCTACAAGAGC	TryR-F	Trypanothione reductase
	GAGGATGTACTCCGTGTCGAG	TryR-R	

(Soleimanifard, Arjmand et al. 2014, Mohebbali, Kazemirad et al. 2019)

حُدِّد مستوى الـ mRNA المنتسخ عن كل جين مدروسة بالنسبة للجين المرجعية باستخدام طريقة Percent Relative Expression (%RER) وذلك من خلال تعيين الدورة الحدية (CT) لكل من الجين الهدف والجين المرجعية ضمن العزلة نفسها، ثم حُسبت قيمة ΔCT الناتجة عن طرح CT الجين المرجعي من CT الجين الهدف بعدها طُبِّقت العلاقة $100 \times (2^{-\Delta CT})$.
 $\%RER = (2)$

6.2. الدراسة الإحصائية:

تم إجراء الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج GraphPad Prism الإصدار (9.5.1) وحُسبت قيم IC50 بعد الحصول على معادلة الانحدار الخطي البسيط الناتجة عن العلاقة بين تركيز مركب البنتوستام وبين نسبة التثبيط المئوية لكل عزلة من العزلات الأربعة. عولجت بيانات التعبير الجيني الناتجة عن تفاعلات qRT-PCR وحُسبت قيمة $100 \times (2^{-\Delta CT})$ باستخدام برنامج Microsoft Excel الإصدار (2010).

طُبِّق اختبار تحليل التباين (ANOVA) لبيان معنوية الفروقات بين العزلات، كما استخدم اختبار توكي متعدد المقارنات Tukey's multiple comparisons test عند مقارنة الاختلافات بين العزلات الأربعة من حيث الجرعة المثبطة للنصف IC50 ومتوسط قيم ΔCT كل جين من الجينات المدروسة. كما قيّم وجود علاقة ارتباط بين المتغيرين IC50 و ΔCT كل جين وفق معامل الارتباط بيرسون Pearson's R.

كررت التجربة ثلاث مرات (n=3) وعُيِّر عن جميع النتائج باحتساب المتوسط \pm الانحراف المعياري mean \pm SD، اعتبرت النتائج معتد بها احصائياً عند $P < 0.05$.

3. النتائج:

1.3. حساب نسبة تثبيط الأشكال الداخلية السوط وتحديد قيم التراكيز المثبطة للنصف IC50:

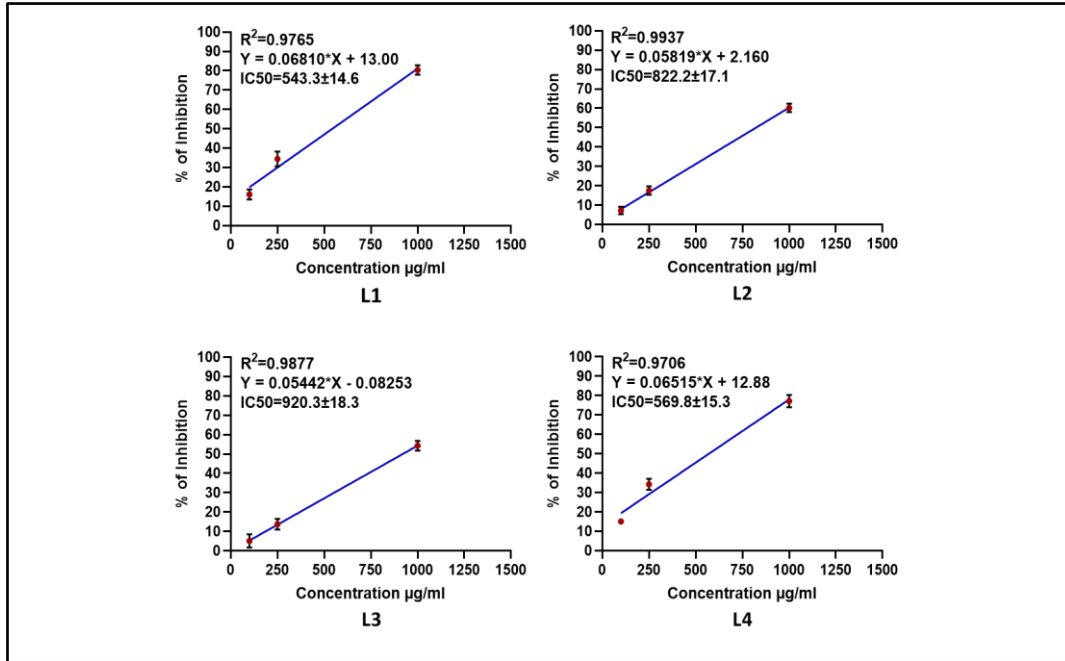
تم حساب نسب التثبيط المئوية في كل عزلة من العزلات الأربعة بعد مضي 24 ساعة على إضافة تراكيز متدرجة من مركب البنتوستام إلى البلاعم المخمجة بالأشكال الداخلية السوط، حيث جاءت النتائج كما هو موضح في الجدول (2).

الجدول (2). نسب التثبيط المئوية التي أظهرتها العزلات المحلية من طفيلي الشمانيا المدارية (L1-L4) مقدرة بـ (%), وذلك بعد 24 ساعة من

معالجتها بثلاثة تراكيز مختلفة من مركب البنتوستام

1000 µg/ml	250 µg/ml	100 µg/ml	
80.36 \pm 2.39	34.46 \pm 3.81	16.11 \pm 2.61	L1
60.21 \pm 2.21	17.52 \pm 2.19	7.30 \pm 1.91	L2
54.29 \pm 2.49	13.81 \pm 2.73	5.12 \pm 3.44	L3
77.17 \pm 3.23	34.33 \pm 2.86	15.09 \pm 1.44	L4

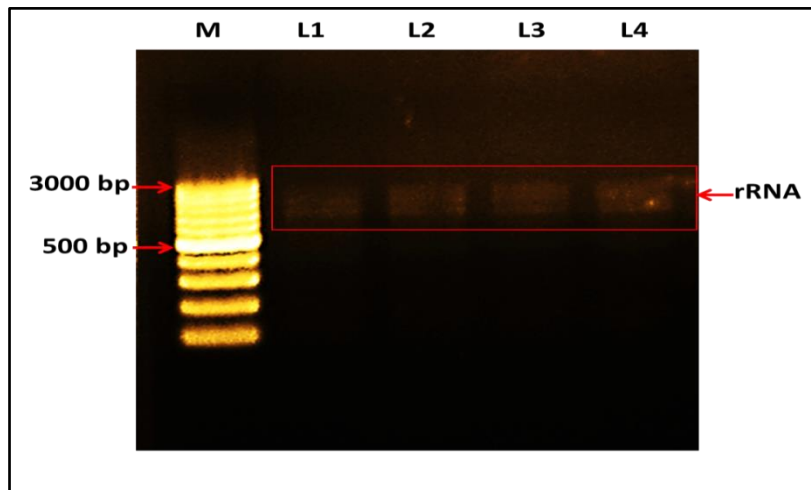
اعتماداً على نسب التثبيط المئوية السابقة حُدِّدت قيمة الجرعة المثبطة للنصف IC50 في كل عزلة من خلال تطبيق معادلة الانحدار الخطي البسيط كما هو موضح في الشكل (1) وسجلت العزلات الأربعة فروقاً معنوية ($p < 0.05$) في قيم IC50 عند مستوى ثقة 95% حيث أظهرت العزلة L3 أعلى قيمة IC50 تلتها العزلة L2 ثم العزلة L4 بينما أعطت العزلة L1 أقل قيمة IC50 بين العزلات الأربعة.



الشكل (1). الخطوط البيانية الناتجة عن رسم العلاقة بين تراكيز مركب البنتوستام ونسب التثبيط المئوية في العزلات (L1-L4), بالإضافة إلى قيمة الجرعة المثبطة للنصف IC₅₀ مقدر بـ µg/ml

2.3. نتائج التعبير الجيني

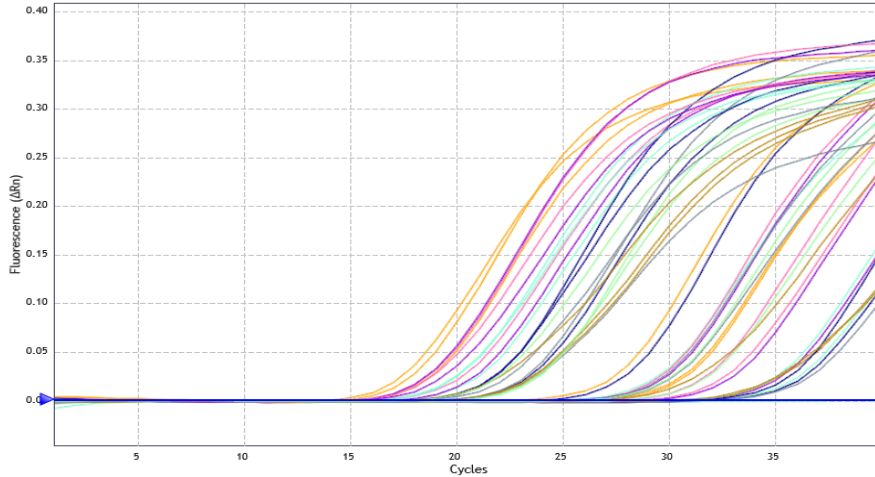
أظهرت عينات الـ RNA الكلي المعزولة درجة نقاوة تراوحت بين 1.82 و 1.88، وعصائب ذات وزن جزيئي منخفض مميزة للـ rRNA الشكل (2) دون وجود أي عصابة ذات وزن جزيئي مرتفع في أعلى البئر مما يؤكد جودة عملية عزل الـ RNA وخلو العينات من الـ DNA الجينومي



الشكل (2). صورة الرحلان الكهربائي الأفقي لعينات الـ RNA الكلي المستخلص من العزلات (L1-L4) على هلامه آغاروز 1%

M: الواسم المعياري 100 bp

أجريت تفاعلات qRT-PCR بعد تحويل كمية ثابتة (1 µg) من الـ RNA الكلي المستخلص من كل عزلة إلى cDNA, حيث ظهرت النتائج على شكل منحنيات تمثل حركية تفاعل التضخيم للجينات المدروسة كما هو موضح في الشكل (3).



الشكل (3). شكل تمثيلي لمنحنيات التضخيم في تفاعلات qRT-PCR

يوضح الجدول (3) نتائج تفاعلات التضخيم في الزمن الحقيقي (qRT-PCR) مُعَبَّرًا عنها كنسبة مئوية من قيمة التعبير عن الجين المرجعي (%RER), حيث يزداد التعبير النسبي عن الـ mRNA كلما انخفضت قيمة ΔCT , ويُظهر اختبار تحليل التباين ANOVA فروقاً معنوية ($p < 0.05$) لمتوسطات قيم ΔCT للجينات *GSH1* و *TryR* و *Pgp A* بين العزلات الأربعة، مما يشير إلى اختلافات ذات دلالة إحصائية في مستوى التعبير النسبي عن هذه الجينات بين العزلات، بينما لم تُظهر الجينات *MRPA* و *AQP1* أي فروق معنوية عند مستوى ثقة 95%.

الجدول (3). القيم المئوية للتعبير النسبي %RER عن الجينات γ -GCS و *MRPA* و *AQP1* و *TryR* و *Pgp A* مقارنة بالجين المرجعية

GAPDH في كل عزلة من العزلات المحلية الأربعة (L1-L4)

F P value	$\%100 \times 2^{-\Delta CT}$	SD	متوسط ΔCT	Isolate	Gene
0.3508	%3.90	0.28	4.68	L1	MRPA
	%3.79	0.19	4.72	L2	
	%3.04	0.14	5.04	L3	
	%3.42	0.21	4.87	L4	
>0.0001	%29.18	0.21	1.78	L1	GSH1
	%45.69	0.09	1.13	L2	
	%65.52	0.06	0.61	L3	
	%30.99	0.21	1.69	L4	
0.1236	%25.70	0.22	1.96	L1	AQP1
	%24.32	0.24	2.04	L2	
	%25.88	0.05	1.95	L3	
	%20.45	0.11	2.29	L4	
>0.0001	%23.16	0.26	2.11	L1	TRYR
	%33.92	0.09	1.56	L2	
	%67.36	0.04	0.57	L3	
	%28.13	0.17	1.83	L4	
0.0008	%5.08	0.15	4.30	L1	Pgp A
	%4.64	0.05	4.43	L2	
	%7.86	0.22	3.67	L3	
	%5.26	0.09	4.25	L4	

يوضح الشكل (4) مخططاً مقارنةً بين العزلات الأربعة (L1 و L2 و L3 و L4) من حيث قيم ΔCT لكل جين من الجينات المدروسة مع الدلالة الإحصائية للفروقات بين كل عزلتين مثلياً عند تطبيق اختبار توكي متعدد المقارنات، حيث لم تُسجَل أي فروق معنوية ($p > 0.05$) في قيم ΔCT بين العزلات الأربعة لكل من جين *MRPA* و *AQP1*، بينما أظهرت نتائج المقارنة للجين γ -GCS (GSH1) فروقاً معنوية ($p < 0.05$) في جميع مثليات العزلات باستثناء المثوية (L4، L1)، أما بالنسبة للجين *TryR* فقد جاءت

تعود قدرة طفيليات اللشمانيا على خفض درجة حساسيتها لمركبات الأنتيموان الخماسية إلى العديد من الآليات والمسارات المختلفة، وعليه فإن الكشف عن المؤشرات الجزيئية المرتبطة بدرجات الحساسية الدوائية المختلفة يُعدُّ أمراً بالغ الأهمية لتحديد ماهية الآليات المسؤولة عن تطوّر المقاومة بين طفيليات اللشمانيا في المناطق الموبوءة (Biyani, Singh et al. 2011)، حيث تُعد قدرة طفيليات اللشمانيا على مقاومة دخول الـ Sb(III) إليها عن طريق خفض نسبة التعبير عن البروتينات القنوية AQP1 (Decuypere, Rijal et al. 2005, Marquis, Gourbal et al. 2005) أو قدرتها على تسريع عملية عزل معقدات Thiol-Sb(III) من خلال زيادة التعبير عن جين المقاومة الدوائية المتعددة MRPA (Mohebbali, Kazemirad et al. 2019, Khanra, Das et al. 2022) من أهم الآليات التي تستخدمها هذه الطفيليات لتطوير مقاومة تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية، إلا أن العزلات الأربعة في دراستنا لم تسجل أي ترابئية معنوية من حيث قيم التعبير النسبي عن الجينات AQP1 وMRPA، وذلك على الرغم من وجود تباين واضح في قيم الـ IC50، حيث سجلت كل من الجينتين قيم ΔCT متقاربة بين العزلات من دون فروق معنوية ($p > 0.05$)، مما يشير إلى اتباع طفيليات اللشمانيا لمسارات أخرى تسمح لها بخفض الأثر السمي الناتج عن مركبات الأنتيموان الخماسية ورفع درجة مقاومتها الدوائية، حيث كشفت نتائجنا عن اصطفااف العزلات الأربعة وفق ترابئية واحدة ($L3 > L2 > L4 > L1$) من حيث قيمة الجرعة المثبثة للنصف (IC50) ومن حيث مستوى التعبير النسبي عن جين GSH1 المُرمز لأنزيم γ -GCS وبالتالي تزايد مستويات الجلوتاثيون GSH في العزلات الأكثر مقاومة (IC50 مرتفع) مقارنة بالعزلات الأقل مقاومة (IC50 منخفض)، كما بيّن التحليل الإحصائي وجود علاقة ارتباط قوية ($r = 0.98$) بين تصاعد مقاومة العزلات وبين ارتفاع مستوى التعبير عن أنزيم γ -GCS، الأمر الذي يتفق مع نتائج دراسة أجريت عام 2022 على عزلات سريرية مقاومة للأنتيموانات خلصت إلى وجود علاقة ارتباط إيجابي بين التعبير عن إنزيم γ -GCS وقيم الـ IC50 (Khanra, Das et al. 2022) كما ربطت عدة دراسات أخرى بين زيادة التعبير عن أنزيم γ -GCS وارتفاع مستوى الثيولات في العزلات السريرية المقاومة للأنتيموانات الخماسية (Torres, Aduai et al. 2010, Neeloo Singh, Mitali Chatterjee et al. 2019, Mohebbali, Kazemirad et al. 2014) وبالمثل لوحظت نفس الترابئية السابقة للعزلات الأربعة فيما يتعلق بزيادة التعبير النسبي عن الجين المرمز لأنزيم اختزال التريبانثيون TryR بشكل يتوافق مع ارتفاع قيم الـ IC50 بين العزلات، كما سجّلت العزلة الأكثر مقاومة L3 زيادة واضحة ذات دلالة إحصائية ($p < 0.05$) في كمية التعبير النسبي عن أنزيم TryR مقارنة بباقي العزلات، الأمر الذي يشير إلى زيادة تركيز الشكل المختزل (T(SH2)) في العزلات الأكثر مقاومة، بما يتفق مع عدة دراسات خلصت إلى أن زيادة مستويات الثيول تلاحظ في العزلات المقاومة لمركبات الأنتيموان الخماسية وتترافق مع تضخيم (amplification) جين TryR وارتفاع مستوى الـ mRNA المنتسخ عنه (Mittal, Rai et al. 2007, Aduai, Schnorbusch et al. 2011, Rai, Bhaskar et al. 2013)، وفي سياق آخر أشارت نتائجنا إلى قدرة العزلة L3 على استخدام أكثر من مسار في آن واحد لخفض درجة حساسيتها تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية حيث أظهرت - إلى جانب تسجيلها لأعلى معدل تعبير عن الجينات γ -GCS(GSH1) و TryR - زيادة معنوية ($p < 0.05$) في قيم التعبير النسبي عن الجين المرمز لمضخة غليكوبروتين Pgp A عن باقي العزلات، بينما لم تظهر العزلات L2, L1, L4 أي فروق معنوية بينها ($p > 0.05$)، وبالتالي تزداد قدرة العزلة L3 على دفع معقدات Thiol-Sb(III) إلى خارج الطفيلي والتخلص من تأثيرها السام (Manzano, García-Hernández et al. 2013, Soleimanifard, Arjmand et al. 2014).

بناءً على ما سبق، خلّصت هذه الدراسة إلى ميل العزلات المحلية الأكثر مقاومة إلى تحفيز إنتاج كلاً من أنزيمي γ -GCS و TryR ضمن مسار استقلابي يهدف إلى إيجاد وفرة من الشكل (T(SH2)) القادر على الاقتران مع الـ Sb(III) تمهيداً لعزله أو طرده خارج الطفيلي (Madusanka, Karunaweera et al. 2024)، يُضاف إلى ذلك أن العزلات الأكثر مقاومة ونتيجة للتحفيز السابق لمسارات اصطناع الجلوتاثيون واختزال التريبانثيون تمتلك زيادة في مستويات الـ GSH و(T(SH2)) وبالتالي تزداد قدرتها على مقاومة الإجهاد التأكسدي من خلال تفاعل هذه الثيولات مع الجذور الحرة وتحييد أثرها الضار على الطفيلي (Mandal, Wyllie et al. 2007, Rai, Bhaskar et al. 2013). بينما يتطلب تحديد دور مضخة PgpA (ABC14) في خفض درجة الحساسية الدوائية عند العزلات المحلية دراسة أوسع لتشمل عدد أكبر من العزلات المحلية المتباينة من حيث درجة مقاومتها الدوائية لمركبات الأنتيموان الخماسية.

5. الاستنتاجات:

- وجود فروق واضحة في درجة الحساسية الدوائية بين الأشكال داخلية السوط التابعة للعزلات المحلية من النوع *L. tropica* تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية (البنتوستام).
- ارتباط انخفاض درجة الحساسية الدوائية تجاه مركبات الأنتيموان الخماسية عند العزلات المحلية بزيادة التعبير عن الجينات GSH1 و TryR.

6. المراجع:

1. Adai, V., K. Schnorbusch, M. Zimic, A. Gutiérrez, S. Decuypere, M. Vanaerschot, S. De Doncker, I. Maes, A. Llanos-Cuentas and F. Chappuis (2011). "Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different in vitro susceptibility to pentavalent antimony." *Parasitology* **138**(2): 183-193.
2. Aït-Oudhia, K., E. Gazanion, B. Vergnes, B. Oury and D. Sereno (2011). "Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field." *Parasitology research* **1**:1232-1225 :09
3. Akhoundi, M., T. Downing, J. Votýpka, K. Kuhls, J. Lukeš, A. Cannet, C. Ravel, P. Marty, P. Delaunay and M. Kasbari (2017). "Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis." *Molecular aspects of medicine* **57**: 1-29.
4. Aronson, N., B. L. Herwaldt, M. Libman, R. Pearson, R. Lopez-Velez, P. Weina, E. M. Carvalho, M. Ephros, S. Jeronimo and A. Magill (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.
5. Beig, M., F. Oellien, L. Garoff, S. Noack, R. L. Krauth-Siegel and P. M. Selzer (2015). "Trypanothione reductase: a target protein for a combined in vitro and in silico screening approach." *PLoS Neglected Tropical Diseases* **9**(6): e0003773.
6. Beverley, S. M., T. Ellenberger, D. Iovannisci, G. Kapler, M. Petrillo-Peixoto and B. Sina (1991). "Gene amplification in *Leishmania*." *Annual Review of Microbiology* **44**:444-417 :(1)45
7. Bhandari, D., K. Guha, N. Bhaduri and P. Saha (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. Biyani, N., A. K. Singh, S. Mandal, B. Chawla and R. Madhubala (2011). "Differential expression of proteins in antimony-susceptible and-resistant isolates of *Leishmania donovani*." *Molecular and biochemical parasitology* **179**(2): 91-99.
9. Borst, P. and M. Ouellette (1995). "New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa." *Annual review of microbiology* **49**: 427-461.
10. Chargui, N., A. Amro, N. Haouas, G. Schönian, H. Babba, S. Schmidt, C. Ravel, M. Lefebvre, P. Bastien and E. Chaker (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. Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." *Clinical microbiology reviews* **19**(1): 111-126.
12. David, C. V. and N. Craft (2009). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." *Dermatologic therapy* **22**(6): 491-502.
13. Decuypere, S., S. Rijal, V. Yardley, S. De Doncker, T. Laurent, B. Khanal, F. Chappuis and J.-C. Dujardin (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. Dowlati, Y. (1996). "Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect".
15. El Fadili, K., N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopoulou, D. Légaré and M. Ouellette (2005). "Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**(5): 1988-1993.
16. Fekrisoofiabadi, M., M. Fekri, A. Moradabadi, R. Vahidi, M. Khaleghi, M. Ram and S. Dabiri (2019). "Evaluation of MDR1 and MRPA genes expression in different types of dry cutaneous leishmaniasis." *BMC Research Notes* **12**: 1-4.
17. Ferreira, C. S., I. Rocha, R. L. M Neto, M. N. Melo, F. Frézard and C. Demicheli (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. Frézard, F., C. Demicheli and R. R. Ribeiro (2009). "Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs." *Molecules* **14**(7): 2317-2336.
19. Frézard, F., R. Monte-Neto and P. G. Reis (2014). "Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites." *Biophysical reviews* **6**: 119-132.

20. Ghatee, M. A., W. R. Taylor and M. Karamian (2020). "The geographical distribution of cutaneous leishmaniasis causative agents in Iran and its neighboring countries, a review." Frontiers in public health **8**: 11.
21. Gossage, S. M., M. E. Rogers and P. A. Bates (2003). "Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle." International journal for parasitology **33**(10): 1027-1034.
22. Hayani, K., A. Dandashli and E. WEISSHAR (2015). "Cutaneous leishmaniasis in Syria: clinical features, current status and the effects of war." Acta dermato-venereologica **95**(1).
23. Herman, J. D., J. V. Gallalee and J. M. Best (1987). "Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid β -oxidation in Leishmania mexicana amastigotes." Biochemical pharmacology **36**(2): 197-201.
24. Hide, M., E. Marion, C. Pomares, R. Fisa, P. Marty and A.-L. Bañuls (2013). "Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers." International Journal for Parasitology **43**(5): 389-397.
25. Inceboz, T. (2019). "Epidemiology and ecology of leishmaniasis." Current topics in neglected tropical diseases: 1-15.
26. Jeddi, F., R. Piarroux and C. Mary (2011). "Antimony resistance in Leishmania, focusing on experimental research." Journal of tropical medicine **2011**(1): 695382.
27. Khanra, S., S. Das, N. R. Sarraf, S. Datta, A. K. Das, M. Manna and S. Roy (2022). "Antimony resistance mechanism in genetically different clinical isolates of Indian Kala-azar patients." Frontiers in Cellular and Infection Microbiology **12**: 1021464.
28. Knight, C., D. Harris, S. Alshammari, A. Gugssa, T. Young and C. Lee (2023). Leishmaniasis: recent epidemiological studies in the Middle East. Front Microbiol **13**: 1052478.
29. Laity, J. H., B. M. Lee and P. E. Wright (2001). "Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity." Current opinion in structural biology **11**(1): 39-46.
30. Madusanka, R. K., N. D. Karunaweera, H. Silva and A. Selvapandiyani (2024). "Antimony resistance and gene expression in Leishmania: spotlight on molecular and proteomic aspects." Parasitology **151**(1): 1-14.
31. Mandal, G., S. Wyllie, N. Singh, S. Sundar, A. Fairlamb and M. Chatterjee (2007). "Increased levels of thiols protect antimony unresponsive Leishmania donovani field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony." Parasitology **134**(12): 1679-1687.
32. Manzano, J. I., R. García-Hernández, S. Castanys and F. Gamarro (2013). "A new ABC half-transporter in Leishmania major is involved in resistance to antimony." Antimicrobial agents and chemotherapy **57**(8): 3719-3730.
33. Marquis, N., B. Gourbal, B. P. Rosen, R. Mukhopadhyay and M. Ouellette (2005). "Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania." Molecular microbiology **57**(6): 1690-1699.
34. Mittal, M. K., S. Rai, S. Gupta, S. Sundar and N. Goyal (2007). "Characterization of natural antimony resistance in Leishmania donovani isolates." The American journal of tropical medicine and hygiene **76**(4): 681-688.
35. Mohebbali, M., E. Kazemirad, H. Hajjaran, E. Kazemirad, M. A. Oshaghi, R. Raoofian and A. Teimouri (2019). "Gene expression analysis of antimony resistance in Leishmania tropica using quantitative real-time PCR focused on genes involved in trypanothione metabolism and drug transport." Archives of dermatological research **311**: 9-17.
36. Neeloo Singh, N. S., M. C. Mitali Chatterjee and S. S. Shyam Sundar (2014). "The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India".
37. Ponte-Sucre, A., F. Gamarro, J.-C. Dujardin, M. P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A. W. Pountain, R. Mwenechanya and B. Papadopoulou (2017). "Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge." PLoS neglected tropical diseases **11**(12): e0.006052
38. Rai, S., Bhaskar, S. K. Goel, U. Nath Dwivedi, S. Sundar and N. Goyal (2013). "Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of Leishmania donovani." PloS one **8**(9): e74862.
39. Soleimanifard, S., R. Arjmand, S. Saberi, A. Khamesipour, M. Kazemi, M. Salehi, M. Akbari and S. Hejazi (2014). "P-glycoprotein a gene expression in glucantime-resistant and sensitive Leishmania major (MRHO/IR/75/ER)." Iranian Journal of Parasitology **9**(3): 423.

40. Tayeh, A., L. Jalouk and S. Cairncross (1997). "Twenty years of cutaneous leishmaniasis in Aleppo, Syria." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **91**(6): 657-659.
41. Torres, D. C., V. Adai, M. Ribeiro-Alves, G. A. Romero, J. Arevalo, E. Cupolillo and J.-C. Dujardin (2010). "Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes." Infection, Genetics and Evolution **10**(6): 727-733.
42. Uliana, S. R., C. T. Trinconi and A. C. Coelho (2018). "Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges." Parasitology **145**(4): 464-480.
43. Wyllie, S., M. L. Cunningham and A. H. Fairlamb (2004). "Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*." Journal of Biological Chemistry **279**(38): 39925-39932.
44. Zabala-Peñafiel, A., G. Dias-Lopes, F. Souza-Silva, L. Miranda, F. Conceição-Silva and C. Alves (2023). "Assessing the effect of antimony pressure on trypanothione reductase activity in *Leishmania (Viannia) braziliensis*." Biochimie **208**: 86-92.