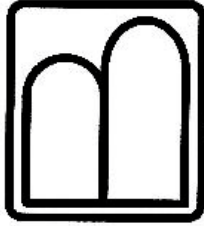


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه پژوهشی برای دریافت درجه

دکترای حرفه‌ای در رشته پزشکی

عنوان:

بررسی اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات (Paraquat) روی

پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش شمارش سلولی و

MTT

استاد راهنما:

دکتر بهنام محمدی قلعه‌بین

دکتر کیوان امیر شاهرخی

استاد مشاور:

دکتر علی نیاپور

نگارش:

محمد آذری راد

پاییز 1397

تقدیم به پدر و مادرم ،

این دو تکیه گاه بزرگ زندگیم، که هر چه دارم مدیون
همراهی و زحمات بی دریغ آنهاست

به پاس فداکاری ها، مهربانی ها و دل نگرانی
هایشان

امروز عزیزترین یادگار هفت سال زندگیم

پیشکش صبوری هایشان

ممنون پدر و مادرم که در این راه سخت مرا یاری
کردید

بر دست هایتان بوسه می زنم

سپاس و تقدیر

از اساتید عزیزم جناب آقای دکتر بهنام محمدی و جناب آقای دکتر کیوان امیر شاهرخی به خاطر زحمتهای فراوان و راهنمایی هایی که در این مدت داشته‌اند سپاس گزاری می‌کنم.

از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر علی نیاپور که بعنوان استاد مشاور مرا راهنمایی نمودند متشکرم.

از همه اساتید فرزانه و فرهیخته‌ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند کمال تقدیر و تشکر را دارم. و در آخر برای تمام بیمارانم که در این مسیر سخت و طاقت فرسای پزشکی با

بیماری شان زمینه‌یادگیری مرا فراهم کردند آرزوی
سلامتی داشته و از همه آنها سپاسگزاری می‌کنم.

اما کلام آخر:

خداوندا

تو را به خاطر همه‌ی خوبی‌ها و

مهربانی‌هایت شکر می‌کنم

ای مهربانترین مهربانان....

فهرست مطالب

صفحه

1	فصل اول: طرح تحقیق.....
2	1-1 مقدمه و بیان مسئله.....
5	1-2 تعریف واژه‌ها.....
6	1-3 اهداف پژوهش.....
6	1-3-1 هدف کلی.....
6	بررسی اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات (Paraquat) به روش شمارش سلولی و MTT.....
6	1-3-2 اهداف اختصاصی.....
6	1-3-3 اهداف کاربردی.....
6	1-3-4 فرضیات و سوالات.....
7	فصل دوم: بررسی متون.....
8	مبانی نظری.....
8	2-1 کلیاتی در مورد لیشمانیوز.....
8	2-1-1 تعریف لیشمانیوز.....
8	2-1-2 تاریخچه.....
8	2-1-3 چرخه:.....
9	2-2 اشکال مختلف بیماری لیشمانیوز.....
9	2-2-1 لیشمانیوز احشایی (کالا آزار).....
10	2-2-2 لیشمانیوز جلدی.....
10	2-3 سیمای بالینی لیشمانیوز جلدی.....
Error! Bookmark not defined.	2-3-1 لیشمانیوز جلدی شهری یا انسان دوست (ACL).....
11	2-3-2 لیشمانیوز جلدی روستایی یا حیوان دوست (ZCL).....
12	2-3-3 لیشمانیوز جلدی منتشر (DCL).....
13	2-3-4 لیشمانیوز جلدی - مخاطی (MCL).....
13	2-3-5 لیشمانیوز مزمن راجعه (LR).....
14	2-4 مورفولوژی:.....
15	2-5 چرخه زندگی.....
17	2-6 ایمنی شناسی لیشمانیازیس.....

17	2-7 انتقال و سرایت بیماری
17	2-7-1 روش اصلی
19	2-7-2 روش های فرعی انتقال
19	2-8 تشخیص:
20	2-9 درمان لیشمانیوز
20	2-9-1 درمان لیشمانیازیس احشایی
21	2-9-2 درمان لیشمانیازیس جلدی
22	2-9-3 سرما درمانی
23	2-9-4 گرمای کنترل شده لوکالیزه شد
23	2-9-5 CO2 Laser
24	2-9-6 مقاومت یا عدم پاسخ به درمان
25	2-10 اپیدمیولوژی و مطالعات
25	2-10-1 اپیدمیولوژی لیشمانیوز در جهان
25	2-10-2 مطالعات دارویی روی لیشمانیوز در جهان
27	2-10-3 اپیدمیولوژی لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران
28	2-10-4 مطالعات دارویی لیشمانیوز جلدی و احشایی در ایران
29	2-10-5 توصیف بیماری لیشمانیوز در استان اردبیل
30	بررسی متون
32	فصل سوم: شیوه اجرای تحقیق
33	3-1 نوع مطالعه
33	3-2 جامعه آماری و روش نمونه گیری
33	3-3 روش انجام کار
34	3-4 روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری
34	3-5 ملاحظات اخلاقی
35	3-6 جدول متغیرهای مطالعه
36	فصل چهارم: نتایج
37	اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

4-1	نتایج حاصل از بررسی اثر پاراکوات در 11 غلظت مختلف بر کاهش میزان بقای پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور به روش MTT.....	37
جدل 4-1	نتایج حاصل از تاثیر پاراکوات در غلظت‌های مختلف روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به روش MTT پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.....	38
4-2	نتایج حاصل از بررسی اثر پاراکوات در 11 غلظت مختلف بر کاهش تعداد پروماستیگوت‌های زنده انگل لیشمانیا ماژور به روش رنگ‌آمیزی حیاتی با تریپان‌بلو و شمارش با هموسایتومتر.....	39
4-3	نتایج حاصل از بررسی اثر گلوکانتیم بر کاهش تعداد پروماستیگوت‌های زنده انگل لیشمانیا ماژور به روش MTT.....	40
4-4	نتایج حاصل از بررسی اثر پاراکوات در 11 غلظت مختلف بر کاهش میزان بقای پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور داخل سلول‌های انسانی به روش MTT.....	41
43	فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری.....	
5-1	بحث.....	44
5-1-1	بحث پاراکوات:.....	44
5-2	نتیجه‌گیری.....	48
5-3	پیشنهادات.....	49
5-4	محدودیت‌های مطالعه.....	50

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

BHI: Brain-Heart Infusion

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DAT: Direct Agglutination Test

IFA: Immunofluorescent Assay

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

MCL: Mucosal-Cutaneous Leishmaniasis

DCL: Diffuse Cutaneous Leishmaniasis

ZCL: Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis

ACL: Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis

LR: Leishmaniasis Recidivans

HIV: Human Immunodeficiency Virus

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell

چکیده

بررسی اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات (Paraquat) روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به

روش شمارش سلولی و MTT

سابقه و هدف: لیشمانیوز گروهی از بیماری های عفونی است که توسط گونه های مختلف جنس لیشمانیا ایجاد می شود و تظاهرات بالینی آن به فرم های جلدی، جلدی مخاطی، احشایی و جلدی منتشر دیده می شود. شیوع این بیماری بسیار بالاست بطوریکه 12 میلیون نفر در جهان با این بیماری درگیر هستند و تخمین زده شده سالیانه دو میلیون ابتلا جدید گزارش می شود. در ایران لیشمانیوز جلدی شایع است. داروهای خط اول مورد استفاده در درمان لیشمانیوز، ترکیبات 5 ظرفیتی آنتیموان (گلوکانتیم) می باشند که دارای عوارض جانبی متعدد مثل مسمومیت دارویی هستند. از سوی دیگر مقاومت انگل نسبت به این دارو در حال افزایش می باشد. داروهای خط دوم از جمله آمفوتریسین B و میلنفوسین می باشند که این داروها نیز دارای عوارض دارویی بوده و هزینه بالایی را به بیماران تحمیل می نماید. با توجه به اثرات سیتوتوکسیک پاراکوات، این مطالعه برای ارزیابی اثر ضد لیشمانیایی پاراکوات روی لیشمانیا ماژور در مقایسه با گلوکانتیم طراحی شد.

مواد و روش ها: بعد از کشت انگل های لیشمانیا ماژور در محیط کشت BHI، به تعداد $2/5 \times 10^6$ سلول در هر چاهک پلیت های 96 خانه اضافه گردید. پاراکوات در رقت های 39، 58/6، 78/1، 117/2، 156/2، 234/3، 312/5، 468/7، 625، 937/5 و 1250 میکروگرم بر میلی لیتر روی آنها اضافه شد. جهت گروه کنترل از داروی گلوکانتیم در رقت های مختلف استفاده شد. پلیت های کشت به مدت 48 ساعت در دمای 24 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سانتیفریوژ شده و محلول رویی خارج گردید، 50 میکرولیتر MTT اضافه گردید. بعد از 3 ساعت انکوباسیون در دمای 24 درجه، 100 میکرولیتر حلال DMSO افزوده و بعد از 15 دقیقه جذب نوری را با دستگاه الیزا ریدر (570nm) قرائت گردید. همچنین تاثیر غلظت های مختلف دارو روی رشد انگل با استفاده از هموسایتومتر و رنگ آمیزی با رنگ حیاتی تریپان بلو انجام پذیرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پاراکوات در محیط کشت، میزان بقای سلولی و تعداد سلول های لیشمانیا در مقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا کرد ($p < 0/05$) و این میزان در غلظت 468 میکروگرم بر میلی لیتر، به صفر میل می کند. در این بررسی IC_{50} برابر با 272/46 میکروگرم بود. یافته های روش شمارش با هموسایتومتر نتایج آزمایش MTT را تأیید کرد.

نتیجه گیری: پاراکوات اثر مهاری قوی روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور دارد. مطالعات بیشتر برای ارزیابی تاثیر پاراکوات به شکل *invivo* لازم می باشد.

کلمت کلیدی: لیشمانیا ماژور، پاراکوات، روش MTT

