

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

... اراده خداوند چون دریاست

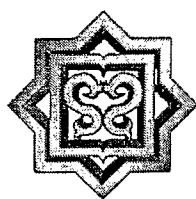
و

آرزوهای ما چون قطره باران در آن گم می شود

یاد می کنیم چنین خدایی را

۱۳۸۹/۳/۱۷

۱۳۸۹-۳



دانشگاه علوم پزشکی

و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

دانشکده پزشکی مهندس افضلی پور

پایان نامه

جهت دریافت درجه دکترای پزشکی

عنوان

بررسی اثر نیتروگلیسیرین بر میزان رشد و تکثیر لیشمانیا تروپیکا در محیط کشت

۱۳۸۹/۳/۱۷

استاد راهنما

دکتر سعدا... شمس الدینی

مجلس استادان دانشکده پزشکی
مجلس استادان دانشکده پزشکی

پژوهش و نگارش

عظیمه سادات پایدار شهر بابک

آذر ماه ۱۳۸۸

۱۳۸۰۰۷



وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی کرمان
دانشکده پزشکی - آموزش بالینی

نمره نهایی دفاع از پایان نامه

پایان نامه تحصیلی دکتر عظیمه سادات پایدار

تحت عنوان بررسی اثر نیتروگلیسرین بر رشد و تکثیر لیشمانیا تروپیکا در محیط کشت.
جهت دریافت درجه دکترای پزشکی عمومی
در تاریخ ۱۳۸۸/۹/۱۸ با حضور اساتید راهنما و اعضای محترم هیئت داوری دفاع و با میانگین نمره
۱۹/۷۳ مورد تایید قرار گرفت.

دکتر شمس الدین
استاد و متخصص
نظام پزشکی

سمت

استاد

استاد یا اساتید راهنما

دکتر سعدالله شمس الدینی

۱۳۸۹/۳/۱۷

مهر و امضای دبیر کمیته بررسی پایان نامه

دبیر کمیته بررسی
نظام پزشکی
۲۴۶۷۲

تذکر:

این فرم می بایست با توجه به نمرات دفاع تکمیل و پس از تأیید توسط استاد یا اساتید راهنما و دبیر کمیته پایان نامه ها به تعداد نسخه های پایان نامه تکثیر و در کلیه پایان نامه ها در زمان صحافی درج گردد.

تقدیم به :

خاک آریایی ، جاویدان سرزمینم

ایران

امید که فرزندی نیک برایت باشم.

تقدیم به پدر بزرگوارم :

که به من اندیشیدن آموخت و در سایه سار حمایتش پریدن را آمودم.

و

تقدیم به نازنین مادرم:

سرچشمه بیکران عطوفت و عشق

که بی حضور مهرش، پیمودن حتی قدمی ممکن نبود.

به پاس تلاش های سپاس نگفته

تقدیم به خواهران عزیزم؛

امیده، حکیمه، فهیمه و نعیمه‌دلبنده

و یگانه برادره کمال

به پاس خوبی های بی دریغ

امید که همه فرداهایتان لبریز پیمان باشد و امکان

تقدیم به :

پدر و مادر عزیز همسر

تکیه گاه سختی ها و همدم تنهایی هایم

درایت فراوان و مهر بیکران تان را سپاس

تقدیم به :

الوه عزیزم

عمار مهربانم

و فاطمه نازنینم

آینده روشن شما، تجلی گاه آرزوهایم است.

...و برای بهترین

زیباترین جلوه زندگی اه؛

احسان

من به سرچشمه خورشید نه خود پر دم راه

ذره ای بودم و مهر تو مرا بالا برد

تقدیم به :

محضر استاد گرانقدر

جناب آقای دکتر شمس الدینی

و سپاس از دانش عظیم و مهر استادانه فراوانشان

و تقدیر از :

جناب آقای رجبعلیان

که اگر حضور ایشان نبود راه به جایی نمی بردم.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱.....	خلاصه فارسی.....
۳.....	خلاصه انگلیسی.....
۵.....	مقدمه.....
۸.....	مواد و روش ها.....
۱۱.....	نتایج.....
۱۴.....	بحث و نتیجه گیری.....
۲۰.....	منابع و مأخذ.....

عنوان: بررسی اثر نیتروگلیسرین بر تکثیر انگل لیشمانیا تروپیکا در محیط کشت

دکتر سعد ا... شمس الدینی، استاد بیماری های پوست؛ عظیمه سادات پایدار،

پزشک عمومی؛ سعید رجبعلیان، کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی.

زمینه و هدف: لیشمانیوز بیماری انگلی با تنوع بالینی گسترده است که به وسیله

انگل تک یاخته متعلق به جنس لیشمانیا ایجاد می شود. درمان در لیشمانیوزیس

انسانی هنوز بر پایه استفاده از ترکیب های آنتی موان ۵ ظرفیتی و پر عارضه است و

مقاومت نسبت به این ترکیبها هم مسأله و مشکلی است که ضرورت تلاش برای

دستیابی به داروی جدید را بیش تر می کند. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان اثر

ضد لیشمانیایی نیتروگلیسرین بر انواع خارج سلولی انگل (پروماستیگوت) لیشمانیا

تروپیکا صورت پذیرفت.

روش اجرا: در این مطالعه اثر نیتروگلیسرین بر میزان رشد و تکثیر

پروماستیگوت های انگل لیشمانیا در محیط کشت آزمایشگاهی، به روش رنگ سنجی

بوسیله کروموژن XTT در مجاورت غلظت های صفر، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰

میکروگرم بر میلی لیتر، بررسی شد.

یافته ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد میزان رشد انگل با افزایش غلظت نیتروگلیسیرین کاهش می یابد. این کاهش رشد در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی داری را نشان داد. ($PV \leq 0.001$)

بحث و نتیجه گیری: نیترو گلیسیرین احتمالاً دارای عوامل مهارى است که موجب کاهش رشد و تکثیر انگل می گردد، در صورت تأثیر مثبت، می توان از آن به عنوان داروی ضد سالک به طور موضعی در بالین بیمار استفاده کرد.

واژه های کلیدی: لیشمانیا، نیتروگلیسیرین، درمان، محیط کشت.

Summary

Determination Efficacy of nitroglycerin on multiplication of Leishmania tropica in vitro.

Saadollh Shamsedini , MD; Azimeh Sadat Paydar , MD; Saeed

Rejabalian , MSc ;

1-prof., Department of Dermatology, 2- General physician , 3-

Cellular and molecular Biology

Instructor Kerman University of Medical Sciences, Kerman , Iran

Background and aim: Leishmaniasis is a parasitic disease with wide clinical diversity caused by protozoan parasite belonging to the genus of Leishmania. Treatment of human leishmaniasis are still based on pentavalent antimoanials but their toxicity and emerging resistance are problem. This study was performed to assess the effect of

nitroglycerin on *L. tropica* promastigotes to find potential new therapeutic method against leishmaniasis.

Materials and Methods: This study has been based colourimetry with XTT assay in vitro . using 0,1,10, 20, 50 and 100µg/ml concentrations of nitroglycerin.

Results: In cuase concentration of nitroglycerin have suppressive effects on multiplication of Leishmani protozoa in culture medium.

Concentration of 50 and 100 µg/ml suppressed multiplication of promastigotes extremely.

Conclusion: These findings suggested that nitroglycerin may be have inhibitory effects on Lesihmania growth in vitro. If we see positive effect, we can use it as a topical anti leishmanieasis in clinical setting.

Key words: leishmaniasis, nitroglycerin, therapy , culture medium

فصل اول

مقدمه

مقدمه:

عامل بیماری لیشمانیوزیس، تک یاخته ای از راسته کینتوپلاست داران است که بر حسب محیط زندگی خود به دو شکل دیده می شود: ۱- پروماستیگوت (Promastigot)؛ دوکی شکل، تاژکدار، با تحرک زیاد که در محیط کشت، روده و خرطوم پشه خاکی دیده می شود و زندگی خارج سلولی را طی می کند (۱-۳). ۲- آماستیگوت (Amastigot)؛ انگل تخم مرغی یا گردویی شکل، کوچک تر از نوع پروماستیگوت و بدون تاژک است که زندگی داخل سلولی اجباری را در سلولهای اپی تلیال پوست و رتیکواندوتلیال احشا حیوانات مهره دار سپری می کند (۴). انگل در بدن سگ و جوندگان به شکل مخزن باقی می ماند و انتقال از حیوان به انسان و گاهی از انسان به انسان به وسیله گونه هایی از پشه خاکی به نام های فلبوتوموس (Phlebotomus) در مناطق دنیای قدیم و لوتزومیا (Lutzomyia) در کشورهای دنیای جدید صورت می گیرد (۶، ۸، ۹).

درمان لیشمانیوزیس در انسان هنوز بر پایه مصرف ترکیب های آنتی موان ۵ ظرفیتی است. اما علاوه بر عوارض کاربرد این ترکیب ها، مقاومت انگل نسبت به آنها هم یک مشکل رو به افزایش است. البته باید اضافه کرد که به دنبال همراه شدن انگل لیشمانیا با ویروس HIV در بدن (Coinfection)، مقاومت انگل نسبت به دارو

افزایش می یابد. (۱) درمان چند دارویی برای مقابله با این مشکل، کاربرد داشته است از جمله در مطالعه ای که در کرمان توسط اسفندیار پور و دبیری انجام گرفته، نتایج مفیدی به دست آمده است. (۷)

بر این اساس پژوهشگران همواره در صدد کشف داروهای ضد لیشمانیایی جدید هستند. در این زمینه تاکنون مطالعات گسترده ای روی عصاره گیاهان و ترکیب های مختلف صورت گرفته که از جمله عصاره اتیل استات از گیاه پودوکالیکس (*Podocalyx lorathoide*) است که علیه پروماستیگوت های لیشمانیا مکزیکانا اثر نسبی دارد (11). روغن لینالول (*Linalool*) که از برگهای *Croton cajucara* گرفته می شود، علیه لیشمانیا آمازونی (12) و نیز عصاره گیاه *Urechites* (*apocunacea*) *Myell arg andrieuui* که گیاهی در شبه جزیره Yucatan است، در درمان لیشمانیوز پوستی کاربرد داشته است. (۱۴ و ۱۳، ۶). دیگر ترکیب های گیاهی به کار گرفته شده شامل: *Gurara*, *Marlia laxiflora*, *Otaba parvifolra*, *Amnosperma*, *Jacaranda caucana*, *Hygrphila*, *panamense*, *polymera* . *guidonia* است (۱۷-۱۵ و ۵).

نیتروگلیسرین از دسته دارویی نیترات ها و یک تولید کننده آگزوژن نیتریک اکساید (NO) است. نیتروگلیسرین در پلاسما هیدرولیز می شود و در کبد و عضله

صاف به وسیله گلوکاتینون-نیترات ردوکتاز سریعاً متابولیزه شده و متابولیت های آن؛ دی نیترات تولید می شوند و سپس به آهستگی به مونو نیترات، تبدیل و در نهایت نیتریک اکساید تولید می شود، این واکنش مستلزم وجود سیستئین و یا یک تیول دیگر است (۱۸). نیتریک اکساید که به شکل رادیکال از منابع داخلی تولید می شود پاسخ ایمنی را در سلولهای میزبان بر علیه انگلهای داخل سلولی لیشمانیا فعال می کند(۱۹) و در مطالعات ایمونولوژیک *in vitro* و *in vivo* نشان داده شده که انگل لیشمانیا توسط ماکروفاژها به واسطه این ماده از بین می رود. (۱۹ و ۲۰) در این مطالعه اثر نیتروگلیسیرین، بر رشد و تکثیر پروماستیگوت های انگل لیشمانیای اخذ شده از بیمار، در محیط کشت آزمایشگاهی با روش رنگ سنجی سنجی(XTT assay) *X thiazole tetrazolium* مورد ارزیابی قرار گرفت.

فصل دوم

مواد و روش ها

روش اجرا:

در این مطالعه اثر نیتروگلیسییرین، بر رشد و تکثیر پروماستیگوت های انگل

لیشمانیا تروپیکا، در محیط کشت آزمایشگاهی با روش رنگ سنجی; XTT assay

(2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-

carboxyanilide) مورد ارزیابی قرار گرفت.

محیط کشت Dolbecos modified medium (DMEM / F12) بدون فنل

قرمز (phenol red) انتخاب شد. این محیط دارای ۱۵ میلی مول بافر HEPES از

کمپانی سیگما، سرم جنین گاوی (FETUS BOVINE SERUM (FBS) از کمپانی

Serumed آلمان و کیت سنجش تکثیر انگل (XTT-Cell proliferation) از کمپانی

Behringer Mannheim آلمان تهیه شد. فلاسک کشت انگل از پلیت های ۹۶ خانه

ای کمپانی NUNC دانمارک انتخاب شد.

انگل از ضایعه جلدی فرد مبتلا به لیشمانیوزیس، که در کرمان عمدتاً ناشی از

L.tropica می باشد جدا گردید. این انگل در محیط کشت DMEM/F12 حاوی FBS

10% که دارای ۱۰۰ واحد پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین

است (محیط کشت کامل)، کشت شد. در تمامی مراحل تحقیق، رشد و تکثیر سلول

های پروماستیگوت بدون تغییر ادامه یافت.