ایجاد مقاومت دارویی در انگل پلاسمودیوم فالسیپارم به روش تماس متناوب دارو

دکتر مهدی ناطق پور [۱] ، دکتراس. ا. وارد [۲] ، دکتر آر.ای. هاولز [۲]

واژه های کلیدی : *پلاسمودیوم فالسیپارم، مقاومت دارویی، تماس متناوب، هالوفانترین*

چکیده

ایجاد مقاومت بطور تجربی در انگل پلاسمودیوم فالسیپارم در مقابل داروهای ضد مالاریا در آزمایشگاهها فرصت گرانبهایی را فراهم می سازد تا مکانیسم و یا مکانیسم های مقاومت مالاریای فالسیپارم علیه داروهای ضد مالاریا در بیماران مبتلا به این بیماری و همچنین نقش مقاومت های متقابل در تشدید مقاومت دارویی و چگونگی تاثیر این داروها مورد مطالعه و ارزیابی بیشتری قرار گیرد.

در ابتدا روش تماس مداوم دارو جایگاه ویژه ای را در مطالعات دارویی به خود اختصاص داده ، به عنوان روش استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. سپس روش های دیگری در زمینه ایجاد مقاومت دارویی معرفی و به کار گرفته شد. تازه ترین روش های ایجاد مقاومت دارویی در انگل پلاسمودیوم فالسیپارم طی این مطالعات معرفی و روش « تماس متناوب دارو » نامگذاری شده است.

با استفاده از این روش دو سویه از انگل پلاسمودیوم فالسیپارم به نام های K1 (مقاوم به کلروکین) و T9.96 (حساس به کلروکین) به داروی ضد مالاریای هالوفانترین مقاوم شدند. نتایج حاصل از ارزیابی دارویی نشان می دهد که تاثیر داروی هالوفانترین از نقطه نظر IC50 بر روی انگل های مقاوم شده K1HF ، T9.96HF در مقایسه با K1 و T9.96 به ترتیب ۹ و ۳ مرتبه کاهش یافته است. عکس العمل انگل های مقاوم به هالوفانترین در برابر داروهای ضد مالاریا مفلوکین و کنین نشان داد که مقاومت متقابل نسبت به داروهای اخیر در انگل های یاد شده پدید آمده است. انگل K1 پس از مقاوم شدن هالوفانترین به میزان قابل ملاحظه ای به داروی کلروکین حساس شد. ولی در حساسیت انگل T9.96 به کلروکین تاثیر چندانی پدید نیامد.

۱- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵ ، تهران.

۲- دانشکده پزشکی گرمسیری لیورپول - انگلستان.

سرآغاز

تماس مداوم انگل های پلاسمودیوم فالسیپارم [1] با داروهای ضد مالاریا در اندازه های غیرکشنده [2] در محیط کشت [3] جهت ایجاد مقاومت دارویی به عنوان روش استاندارد همواره مدنظر بوده است (۱۳،۱۱،۸،۱۲).

در سال ۱۹۸۱ روشی گزارش شد که با استفاده از آن توانستند یک سویه [4] پلاسمودیوم فالسیپارم نسبتاً مقاوم به مفلوکوئین [5] تولید کنند (۳). دراین روش انگل ها به مدت ۴۸ ساعت در تماس مداوم دارو با غلظت های مختلف قرار گرفته، پس از آن به محیط کشت معمولی منتقل می شدند تا بتوانند چند دورهٔ تکثیر را در آن بگذرانند. گرچه با استفاده از این روش انگل هایی بالنسبه مقاوم به مفلوکوئین بدست آمد ولی هیچگونه اشاره ای نسبت به پایداری مقاومت این انگلها در مقابل مفلوکوئین نشده است.

مطالعات انجام شده در زمینه ایجاد مقاومت دارویی در انگل های پلاسمودیوم فالسیپارم منجر به روشی شد که روش تماس متناوب دارو [6] نامگذاری شده است با استفاده از این روش دو سویهٔ مقاوم به داروی هالوفانترین به نام های K_1HF و T9.96HF بدست آمد.

نمونه گیری و روش بررسی

دراین مطالعه دو سویهٔ مختلف از پلاسمودیوم فالسیپارم به نامهای K_1 [7] (مقاوم به کلروکوئین) و $T_{9.9\%}$ [8] (حساس به کلروکوئین) مورد استفاده قرار گرفتند.

نگهداری و تکثیر انگل ها با اعمال تغییراتی برمبنای روش جنسن و تراگر انجام گرفت (۱۰).

هالوفانترین هایدروکلراید [9] که بصورت پودر تهیه شده بود در محلول ۷۰٪ اتانول (با آب مقطر) حل و سپس بمدت پانزده دقیقه در دستگاه اولتراسونیکاتور [10] مرتعش گردید تا محلول ذخیره با غلظت $10^{-3}M$ بدست آید. آنگاه محلول ذخیره در دمای یخچال (4^{0C}) نگهداری می شد تا در مواقع لزوم مورد استفاده قرار گیرد. تهیهٔ محلول ذخیره هر دو الی سه هفته یکبار تکرار می شد تا همواره داروی محلول تازه در دسترس باشد.

1- *Plasmodium falciparum*
2- Sublethal
3- In vitro
4- Strain
5- Mefloquine
6- Intermittent Drug Exposure
9- Hydrochloride
10- Ultrasonicator

۷- K_1 سویه‌ای است که توسط Thanthong & Beal (1981) از منطقه کان چان بوری واقع در مرز تایلند از یک بیمار مقاوم به کلروکوئین جدا شده است. این سویه به کلروکوئین، پریمائین و احتمالا کوئین مقاوم است.

۸- $T_{9.9\%}$ کلونی است از سویه T_1 که توسط Rosario (1981) کلونایز (Clonize) شده است. سویه T_1 [illegible] جدا کردیده، که دارای کولن های حساس و مقاوم به کلروکوئین است. کولن $T_{9.9\%}$ به کلروکوئین و پریمائین حساس است.

برای ایجاد مقاومت، ابتدا سویهٔ K_1 و کلون $T_{9.9\%}$ به ترتیب درتماس مداوم با غلظت های (IC40)[1] ۱/۷ و (IC25)[2] ۲/۵ نانومول در لیتر هالوفانترین قرار گرفتند. در روز بیست و نهم سویهٔ K_1 که به غلظت ۱/۷ نانومول مقاوم شده بود تحت تاثیر غلظت ۲/۵ نانومول قرار گرفت. همچنین کلون $T_{9.9\%}$ که به غلظت ۲/۵ نانومول مقاوم شده بود در روز سی ام در تماس با غلظت ۳/۲ نانومول قرار داده شد.

سپس به دنبال مرحلهٔ تماس مداوم دارو، انگل های مقاوم شده بطور متناوب تحت تاثیر داروی هالوفانترین قرار گرفتند. سویهٔ جدا شده از K_1 بطور متوالی در تماس با غلظت های ۳/۲، ۴/۵ و ۸ نانومول دارو قرار گرفت. همینطور سویهٔ منشاء گرفته از $T_{9.9\%}$ بطور متوالی تحت تاثیر غلظت های ۴/۵ ، ۸ و ۱۰ نانومول هالوفانترین قرارگرفت.

دراین روش انگل ها درتماس مداوم با غلظت های مذکور قرار داده می شدند همینکه جمعیت انگل ها [3] به علت تاثیر دارو تا حد ۴۰٪ کاهش می یافت، هر محیط کشت به دو قسمت تقسیم می شد (محیط کشت حاوی غلظت مورد نظر دارو و محیط کشت نرمال). انگل هایی که در محیط کشت حاوی دارو قرار داشتند به تدریج کاهش یافته، بالاخره از بین می رفتند ولی گروه دیگر انگل ها که به محیط کشت نرمال انتقال داده شده بودند، پس از مدتی به حالت عادی بازگشته و رشد و تکثیر خود را از سر می گرفتند. پس از اینکه رشد و تکثیر انگل ها در مقایسه با محیط کشت شاهد (کنترل) وضعیت طبیعی خود را بازیافتند مجدداً انگل ها به محیطی که حاوی غلظت قبلی دارو بود برگردانده شدند و این روش مکرراً ادامه می یافت تا اینکه انگل ها پس از چند مرحله کشت متناوب در محیط حاوی دارو و بدون دارو، دیگر متاثر از غلظت مورد نظر دارو نشده و همچنان به رشد و تکثیر خود ادامه دادند. جهت اطمینان کامل از مقاومت انگل ها در این مرحله اجازه داده می شد تا انگل ها به مدت ده روز متوالی در غلظت مورد نظر دارو باقی مانده، به رشد وتکثیر خود ادامه دهند. پس از ده روز انگل های مقاوم شدهٔ این مرحله در محیطی حاوی غلظت بیشتر دارو کشت داده می شدند. این عمل تا آنجا تکرار می شد که تفاوت قابل ملاحظه ای در IC50 سویهٔ مقاوم جدید و والدین آن نسبت به هالوفانترین ملاحظه شود. در پایان هر مرحله از مراحل تدریجی ایجاد مقاومت، مقداری از انگل های مقاوم شدهٔ در آن مرحله منجمد می شدند (۲۱) تا اگر بطور اتفاقی محیط های کشت، آلودگی میکربی پیدا کردند بتوان از انگل های منجمد شده استفاده کرد.

پس از برقراری مقاومت در هر مرحله، انگل ها به نام اصلی خود به اضافهٔ HF و شمارهٔ آن مرحله، نامگذاری می شدند. برای مثال پلاسمودیوم فالسیپارم جدا شده از K_1 پس از مقاوم شدن به غلظت های ۱/۷ ، ۲/۵ و... به ترتیب به صورت K_1HF^1 ، K_1HF^2 و..نامگذاری

۱- (40% inhibitory concentration)IC40 غلظتی از دارو که مانع رشد و تکثیر ۴۰٪ از انگلها می شود
۲- (25% inhibitory concentration)IC25 غلظتی از دارو که مانع رشد و تکثیر ۲۵٪ از انگلها می شود
3- Parasitaemia

شدند. همینطور پلاسمودیوم فالسیپارم جدا شده از $T_{9.96}$ بصورت $T_{9.96}HF_1$، $T_{9.96}HF_2$ و... نامیده شدند. درانتهای مطالعه سویه های جدید که IC50 آنها در مقایسه با والدینشان به میزان قابل توجهی در مقابل هالوفانترین افزایش یافته بود با عناوین K_1HF و $T_{9.96}HF$ نامگذاری شده و بصورت رسمی بعنوان سویه های مقاوم در برابر هالوفانترین شناخته شدند.

سپس ارزشیابی عکس العمل سویه های K_1HF ، $T_{9.96}HF$ ، K_1 و $T_{9.96}$ علیه داروهای آمودیاکوئین [1] ، کلروکوئین ، هالوفانترین ، مفلوکوئین ، چینگ هاسو [2]، کونین [3] و پای ریمتامین [4] با اعمال بعضی تغییرات در روش ارزشیابی سال ۱۹۷۹ (۷) انجام گرفت. خلاصه روش تست های انجام شده دراین مطالعه بدین قرار است :

الکل اتیلیک ۷۰٪ در آب مقطر به عنوان حلال داروهای مذکور - بجز پای ریمتامین مورد استفاده قرار می گرفت. از دی متیل سولفوکساید [5] ۵٪ در اتانول به عنوان حلال پای ریمتامین استفاده می شد. داروها در حلال ها به گونه ای حل می شدند که غلظت $10^{-2}M$ بدست آید. غلظت یاد شده در محیط کشت رقیق می شد تا غلظت های مورد نظر بعدی بدست آید.

برای ارزشیابی، پلیتهای ۹۶ حفره ای مورد استفاده قرار می گرفتند. معمولاً سه حفره از ردیفهای ۵ و ۶ که مجموعاً ۶ حفره بودند [6] به عنوان حفره های شاهد انتخاب می شدند. سه حفره از اولین ردیف (ردیف شماره یک) به مقدار مورد نظر از خون تحت عنوان زمینه [7] اختصاص می یافت. حفره های باقیمانده (سه حفره از هر ردیف) برای غلظتهای انتخابی دارو در نظر گرفته می شدند که معمولاً از کمترین غلظت در ردیف شماره ۲ شروع شده و بتدریج در ردیف های دیگر افزایش می یافت. صد میکرولیتر از مدیوم معمولی به هر کدام از حفره های شاهد و زمینه ریخته می شد، همچنین صد میکرولیتر از غلظت های مورد نظر دارو که قبلاً ساخته شده بودند به حفره های مربوط اضافه می شدند. به هر حفره بجز حفرات زمینه مقداری خون آلوده به انگل که میزان انگلی آن ۱٪ بود بگونه ای اضافه می شد که در نهایت در هر حفره سوسپانسیونی با ۴/۵٪ هماتوکریت [8] بدست آید. به هر حفره از حفره های زمینه، خون غیرآلوده به انگل اضافه می شد تا یک هماتوکریت ۴/۵٪ حاصل شود. سپس پلیت ها با استفاده از یک اطاقک گاز [9] به مدت دودقیقه با مخلوطی از گازهای $N_2(93\%)$ و $CO_2(4\%).O_2(3\%)$ گازدهی می شدند. اطاقک گاز بهمراه پلیت های موجود در آن در یک انکوبیتور در دمای 37^{0C} بمدت ۲۴ ساعت نگهداری

1- Amodiaquine
2- Chinghaosu
3- Quinine
4- Pyrimethamine
5- Dimethyl sulfoxide, DMSO
6- Two-fold triplicate
7- Background
8- Haematocrit
9- Modular incubator chamber

می شدند. سپس پلیت ها از اطاقک گاز خارج شده، به هر حفره ای از حفره های مورد نظر مقدار ۰/۵ µci از هایپوگزانتین [1] رادیواکتیو شده، اضافه می شد. مجدداً پلیت ها به داخل اطاقک گاز برگردانده شده، به روشی که گذشت گازدهی می شدند. عمل اینکوبیشن در مرحلهٔ دوم نیز مانند مرحلهٔ اول بود. پس از پایان اینکوبیشن مرحله دوم پلیت ها از اطاقک گاز خارج شده، با وسیله ای [2] محتوای حفره ها بطور جداگانه و با استفاده از نوعی عمل شستشو و بر روی کاغذهای مخصوصی [3] جمع آوری می شدند. کاغذها در حرارت اطاق رها می شدند تا خشک شوند. پس از این مرحله بخش هایی از کاغذ خشک شده که محتویات حفره های پلیت ها بر روی آنها جمع آوری شده بودند، جدا شده، در داخل لوله های پلاستیکی مخصوصی [4] قرار می گرفتند. داخل هر لوله به مقدار ۴ میلی لیتر از مایع مخصوصی [5] ریخته می شد. لوله ها پس از بسته شدن درهایشان داخل ماشین شمارش [6] قرار می گرفتند تا تعداد انگل هایی که اکنون با مواد رادیواکتیو علامت گذاری شده اند مشخص شود. شمارش بر مبنای DPM [7] انجام می پذیرفت. نتایج حاصل از شمارش توسط کامپیوتر ضبط و آنالیز می شد تا میزان IC50 بدست آید. IC50 معمولاً به دو طریق بدست می آمد، یکی با استفاده از برنامهٔ کامپیوتری که برمبنای Log probit برنامه ریزی شده بودو دیگری با استفاده از کاغذهای نیمه لگارتیمی [8]

یافته ها

چگونگی ایجاد مقاومت در سویهٔ K_1 نسبت به غلظت های ۱/۷ و ۲/۵ نانومول در لیتر هالوفانترین و در کلون $T_{9.96}$ نسبت به غلظت های ۲/۵ و ۳/۲ نانومول در لیتر دارو در نمودارهای شماره ۱ و ۲ نمایش داده شده است. پس از اینکه سویهٔ K_1 در معرض ۱/۷ نانومول هالوفانترین قرار گرفت، رشد انگل ها در مقایسه با کنترل، تاحد ۶٪ ، در روز ششم، کاهش یافت ولی پس از آن ، رشد و تکثیر انگل ها افزایش یافته در روز بیستم به حد کنترل رسید. این سویه مقاوم به هالوفانترین K_1HF_1 نامگذاری شد. ده روز پس از تماس مداوم سویهٔ K_1HF_1 با غلظت ۲/۵ نانومول دارو علائم مقاومت در آن پدیدار گشت. در روز هیجدهم محیط کشت مذکور مبتلا به آلودگی شدید باکتریایی شد که خوشبختانه انگل هایی از همین محیط کشت که در روز شانزدهم منجمد شده بودند مجدداً به محیط کشت بازگردانده ، خط ایجاد مقاومت حفظ شد. انگل های مقاوم به غلظت اخیر K_1HF_2 نامگذاری شدند. علیرغم دوبار تلاش به منظور ایجاد مقاومت در سویهٔ K_1HF_2 علیه غلظت ۳/۵ نانومول در لیتر دارو با استفاده از روش تماس مداوم دارو موفقیتی بدست نیامد.

1- [G-3H] Hypoxanthine
2- Titertek cell harvester
3- Glass fibre mat
4- Scintillation vials
5- Scintillation fluid
6- Scintillation counter
7- Disintegration per minute
8- Semi-log papers

ایجاد مقاومت دارویی در کلون $T_{9.96}$ علیه غلظت ۲/۵ نانومول در لیتر هالوفانترین ، پس از پـــانزده روز تمـــاس مداوم انگل با دارو، حاصل و سویهٔ جدید، $T_{9.96}HF_1$ نام گذاری شد. انگل های مقاوم به غلظت ۲/۵ نانومول ، پس از شانزده روز تماس مداوم با غلظت ۳/۲ نانومول دارو ، به غلظت اخیر مقاوم شدند. سویهٔ مقاوم، $T_{9.96}HF_2$ نامیده شد. در مورد پلاسمودیوم فالسیپارم $T_{9.96}HF_3$ نیز، علیرغم دوبار تلاش به منظور ایجاد مقاومت در آن علیه غلظت ۴/۵ نانومول دارو، با استفاده از روش تماس مداوم دارو نتیجه ای حاصل نشد.

نمودارهای شماره ۵ - ۳ سیر زمانی ایجاد مقاومت در پلاسمودیوم فالسیپارم K_1HF_2 علیه غلظت های ۳/۲ ، ۴/۵ و ۸ نانومول در لیتر دارو را نشان می دهد. همانگونه که نشان داده شده است، تا هشت روزاول، غلظت ۳/۲ نانومول دارو تاثیر چندانی در رشد و تکثیر انگل های K_1HF_2 نداشت ولی از روز هشتم رشد و تکثیر انگل ها رو به کاهش نهاد. در روز شانزدهم تعدادی از انگل ها از تماس با داروها رها شده و با محیط معمولی کشت شـــدند که در نمودارها با خط نقطه چین نشان داده شده اند. مابقی انگل ها همچنان درتماس با دارو قرار گرفتند که در روز هیجدهم از بین رفتند و در نمودارها با خط پیوسته نشان داده شده اند. انگل هایی که با استفاده از محیط معمولی کشت داده شده بودند، رشد و تکثیر خود را از سرگرفته در روز بیستم مجدداً در تماس با غلظت ۳/۲ نانومول دارو تماس داده شدند. پس از این تماس رشد وتکثیر انگل ها اندکی کاهش یافته ولی پس از چند روز توانستند در مقابل تاثیر دارو مقاومت نشان دهند. سویهٔ مقاوم، K_1HF_3 نام گذاری شد. تماس پلاسمودیوم فالسیپارم K_1HF_3 با ۴/۵ نانومول در لیتر هالوفانترین ، با کاهش تدریجی رشد و تکثیر انگل همراه بود، به گونه ای که در روز چهاردهم تعدادی از انگل ها با محیط معمولی کشت شدند. باقیمانده انگل ها که همچنان در تماس با دارو بودند، در روز بیستم از بین رفتند. انگل های احیاء شده در روز نوزدهم مجدداً با دارو تماس داده شدند که متعاقب آن انگل های K_1HF_3 به غلظت ۴/۵ نانومول دارو نیز مقاوم شدند. سویهٔ حاصل، K_1HF_4 نام گذاری شد. پس از این مرحله انگل های اخیر در تماس با غلظت ۸ نانومول در لیتر هالوفانترین قرار گرفتند. از آنجا که این غلظـــت از دارو نزدیـــک به دو برابر غلظت ماقبل بود، لذا تعداد تناوب بیشتر یا مدت زمان طولانی تری را طلب کرد، به گونه ای که پس از سه تناوب، عاقبت انگل های K_1HF_4 به غلظت ۸ نانومول دارو مقاوم شدند. که سویهٔ حاصل به عنوان سویهٔ نهایی پلاسمودیوم فالسیپارم مقاوم به هالوفانترین که از K_1 جدا شده است قلمداد شده و K_1HF نام گذاری شد.

نمودارهای شماره ۶- ۸ سیر زمانی ایجاد مقاومت در پلاسمودیوم فالسیپارم $T_{9.96}HF_2$ در مقابل غلظتهای ۴/۵ ، ۸ و ۱۰ نانومول در لیتر هالوفانترین را نشان می دهد. تکثیر انگل های سویهٔ یاد شده پس از تماس با غلظت ۴/۵ نانومول دارو، رو به کاهش نهاده، در روز هشتم از بین رفتند ولی قبل از مرگ کامل انگل ها، در روز سوم تعدادی از آنها از محیط کشت حاوی دارو خارج و با محیط معمولی کشت داده شدند که در نمودارها با خط نقطه چین نشان داده شده اند.

انگل های اخیر سلامت رشد و تکثیر خود را در روز هفتم باز یافته و مجدداً با غلظت ۴/۵ نانومول دارو تماس داده شدند. به علت توقف رشد و کاهش تکثیر انگل ها ، مجدداً عمل تناوب در روز هیجدهم تکرار گردید که عاقبت در روز سی ام انگل ها به غلظت ۴/۵ نانومول مقاوم شدند. انگل هـــای مقاوم، $T_{9.96}HF_3$ نـــام گرفتند. در آخرین مرحله از ایجاد مقاومت دارویی، انگل های $T_{9.96}HF_4$ ابتداناً با غلظت ۲۰ نانومول در لیتر هالوفانترین تماس داده شدند که پس از سه دورهٔ تناوب غلظت دارو به ۱۰ نانومول کاهش داده شد که متعاقب این کاهش پس از یک دوره تناوب، انگل ها در روز سی وششم به غلظت اخیر مقاوم شده،$T_{9.96}HF$ نام گذاری شدند. سویهٔ $T_{9.96}HF$ بامنشاء $T_{9.96}$ به عنوان یکی از سویه های مقاوم به هالوفانترین معرفی شدند.

حساسیت K_1HF و $T_{9.96}HF$ نسبت به هالوفانترین در مقایسه با K_1 و $T_{9.96}$ - سویه های منشاء - به میزان قابل ملاحظه ای کاهش یافت بگونه ای که IC50 برای سویه های یاد شده علیه داروی مذکور و در مقایسه با سویه های منشاء به میزان ۹/۰۹ و ۳/۳۳ برابر افزایش پیدا کرد واز ۲/۲ و ۶/۶ نانومول برای K_1 و $T_{9.96}$ به ۲۰ و ۲۲ نانومول برای K_1HF و $T_{9.96}HF$ به ترتیب افزایش یافت (نمودارهای ۹ و ۱۰ و شترنگه ۱). حساسیت سویه های K_1HF و $T_{9.96}HF$، K_1 و $T_{9.96}$ نسبت به کلروکوئین ، کونین ، مفلوکوئین ، آمودیاکوئین، چینگ هاسو و پای ریمنامین مورد بررسی قرار گرفته. مقاومت های متقابل مشخص شدند (شترنگه ۱). نتایج نشان می دهد که برقراری مقاومت علیه هالوفانترین در K_1 - سویه مقاوم به کلروکوئین - موجب کاهش حساسیت اخلاف این انگل در مقابل مفلوکوئین ، کونین و چینگ هاسو و افزایش حساسیت در مقابل کلروکوئین شده است.

ایجاد مقاومت علیه هالوفانترین در $T_{9.96}$ (کلون حساس به کلروکوئین) باعث افزایش IC50 در اخلاف این انگل در مقابل مفلوکوئین، کونین ، چینگ هاسو و پای ریمنامین شده، ولی تغییر چندانی در مقابل کلروکوئین و آمودیاکوئین نکرده است.

پایداری مقاومت علیه هالوفانترین در سویه های K_1HF و $T_{9.96}HF$پس از ۶ هفته پرورش در محیط کشت عاری از دارو و همچنین پس از انجماد و ذخیره سازی در مایع نیتروژن[1] آزمایش و تایید شده است.

گفتگو و بهره گیری پایانی

هالوفانترین (WR 171, 669) یکی از ترکیبات گروه ۹ - فینان ترین متانول[2] از خانواده آمینوالکل ها[3] است (۱۹.۵.۱۸).

1- Nitrogen liquid

2- 9-Phenanthrenemethanol

3- Aminoalcohols

این دارو از نظر شیمیایی با کوئین و مفلوکوئین هم گروه بوده، هرسه به گروه خاصی[1] تعلق دارند. تحقیقات بعضی از دانشمندان نشان داده است که هالوفانترین تاثیر قابل توجهی برهر [illegible] از سویه های پلاسمودیوم فالسیپارم مقاوم و یا حساس به کلروکوئین دارد (۶،۱۸، [illegible]). نتایج بدست آمده دراین مطالعه نشان می دهد گرچه هالوفانترین بر هر دو سویهٔ مقاوم و حساس به کلروکوئین موثر است ولی این تاثیر بر K_1 (سویهٔ مقاوم به کلروکوئین) تاثیر بیشتری دارد.

فارماکوکینتیک[2] هالوفانترین درانسان از نقطه نظرهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (۴). نتایج نشان می دهد که میزان جذب هالوفانترین هایدروکلراید در بدن متغیر است. لذا گاهی بازگشت مالاریای فالسیپارم ، متعاقب درمان با هالوفانترین را، به غلظت ناکافی دارو در خون بیماران نسبت داده اند (۱). هالوفانترین هایدروکلراید از نیمه عمری در حدود ۲/۶ - ۱ روز برخـــوردار است (۴،۱). از نظر کلینیکی داروی هالوفانترین بخوبی توسط بیماران تحمل می شود و عمومی ترین عارضهٔ آن ناراحتی های ملایم و گذرای دستگاه گوارش[3] است (۱۷،۹). همچنین گزارش های منتشره، از طرف محققان، نشان دهندهٔ بروز پاره ای عوارض قلبی در تعدادی از درمان شوندگان با هالوفانترین است (۲۲).

دراین مطالعه سعی شده است تا بطور تجربی و با استفاده از روش جدیدی ، به نام تماس متناوب دارو، سویه هایی از پلاسمودیوم فالسیپارم مقاوم به هالوفانترین تولید شود، چه اینکه ما اعتقاد داریم روش مذکور، به مکانیسم ایجاد مقاومت در طبیعت نزدیک تر است ، از طرف دیگر در داروهایی مانند هالوفانترین که تفاوت غلظت ها در IC50 و IC99 بسیار کم است، استفاده از روش تمـــاس متناوب دارو به مراتب نسبت به تماس مداوم دارو به زمان کمتری نیاز دارد تا مقاومت معنی داری در پلاسمودیوم فالسیپارم برقرار شود. انتخاب هالوفانترین به عنوان داروی مورد مطالعه بر سه دلیل استوار بوده است، تاثیر قابل توجه آن بر مالاریای فالسیپارم مقاوم و یا حساس به کلروکوئین، هم گروهی باکوئین و مفلوکوئین دو داروی مهم دیگر ضد مالاریا و بالاخره به علت احتمال انتخاب آن به عنوان جانشین بعضی داروهای ضد مالاریا در آیندهٔ نزدیک .

پس از ۶ ماه با استفاده از روش تماس متناوب دارو، IC50 هالوفانترین برای سویه های K_1HF و $T_{0.99}HF$ در مقایسه با سویه های K_1 و $T_{0.99}HF$ به ترتیب ۹/۰۹ و ۳/۳۳ برابر افزایش یافت و این در حالی است که بعضی از محققان پس از ۲۲ ماه تماس مداوم دارو، موفق شدند IC50 مفلوکوئین برای سویهٔ W_2-mef را، در مقایسه با W_2 (سویهٔ منشاء) تنها ۴/۳ برابر افزایش دهند (۱۳). با توجه به پایین بودن IC50 هالوفانترین نسبت به IC50 مفلوکوئین در سویه های K_1HF و $T_{0.99}HF$ ، می توان حدس زد که با استفاده از روش تماس مداوم دارو مدت زمان بیشتری لازم بود تا مقاومت معنی داری در سویه های مذکور نسبت به هالوفانترین پدید آید.

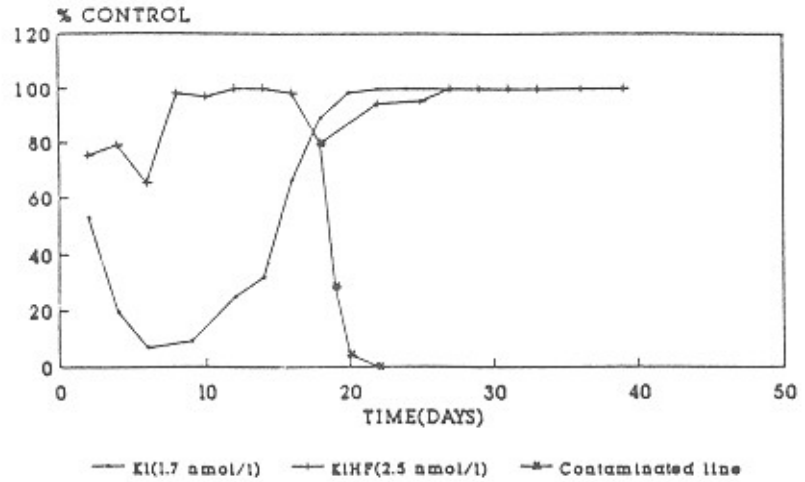
1- Methanolic Functional Group
2- Pharmacokinetic
3- Gastrointestinal symptoms

نتایج حاصل از این مطالعات نشان می دهد که سویه K_1 سریعتر از $T_{0.99}$ به دارو مقاوم شده است. از آنجا که K_1 یک سویهٔ هتروژن[1] و $T_{0.99}$ یک کولن هموژن[2] است ، لذا این تفاوت را می تـــوان یکی از علل مهم زودتر مقاوم شدن K_1 به هالوفانترین دانست. اصولاً در یک سویه غیر کولن[3] افراد متنوعی از نظر ژنتیکی قرار دارند که عکس العمل آنها نسبت به تاثیر داروها متفاوت است و همین تفاوت می تواند زمینه را برای زودتر مقاوم شدن سویه به دارو فراهم آورد. درحالی که یک دست بودن افراد یک سویه کولن شده شرایط دشوارتری را به منظور ایجاد مقاومت فراهم می کند. البته علل دیگری را نیز می توان برای تفاوت پذیرش مقاومت در سویه های مختلف درنظر گرفت که به مطالعات دقیق تر و گسترده تری نیاز دارد. نتیجهٔ مشابهی نیز به هنگام ایجاد مقاومت علیه کلروکوئین در سویه کولن شده و کولن نشده ای از *P.berghei* توسط بعضی محققان بدست آمده است (۱۴).

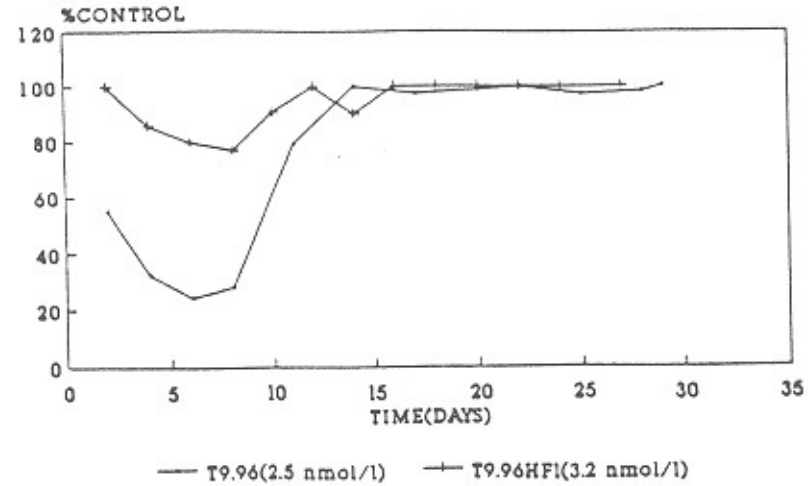
نتایج بدست آمده بیانگر آن است که مقاومت به هالوفانترین باعث بروز مقاومت متقابل درتعدادی از داروهای ضد مالاریا ، بخصوص مفلوکوئین و کونین شده است که خود می تواند نوعی پیش آگهی در استفاده از داروهای یاد شده باشد. از طرف دیگر افزایش حساسیت K_1HF به کلـــروکوئین که ابتداءاً به آن مقـــاوم بوده است ، نشان می دهد. ایجاد مقاومت به هالوفانترین در انگل های مقاوم به کلروکوئین با کاهش مقاومت به این داور همراه است. تحقیقات نشان می دهد که ایجاد مقاومت در مالاریای جوندگان مانند *P.berghei* علیه هالوفانترین با مقاومت متقابل علیه کلروکوئین همراه بوده است (۱۵). این نتایج مغایر با یکدیگر می تواند به نوعی اختلاف در برقراری مقاومت دارویی بین مالاریای انسان و مالاریای جوندگان اشاره داشته باشد. چنانکه *P.berghei* مقاوم به هالوفانترین ، پس از توقف تماس با دارو و یا پس از ذخیره سازی در مایع نیتروژن ، بسرعت مقاومت خود را از دست داد ولی K_1HF و $T_{0.99}HF$ توانستند مقاومت به هالوفانترین را در شرایط یاد شده همچنان حفظ کنند.

بطور خلاصه تماس متناوب پلاسمودیوم فالسیپارم با هالوفانترین منجر به برقراری مقاومت دارویی پایدار در انگل در زمان کوتاهی شد. مقاومت به هالوفانترین در پلاسمودیوم فالسیپارم مقاوم به کلروکوئین با مقاومت متقابل علیه مفلوکوئین و کونین و با افزایش حساسیت به کلروکوئین همراه بوده است ولی در پلاسمودیوم فالسیپارم حساس به کلروکوئین تنها بامقاومت متقابل علیه مفلوکوئین و کونین همراه بوده است وتغییر چندانی در حساسیت آن نسبت به کلروکوئین پدید نیامد.

1- Heterogene
2- Homogene
3- Uncloned



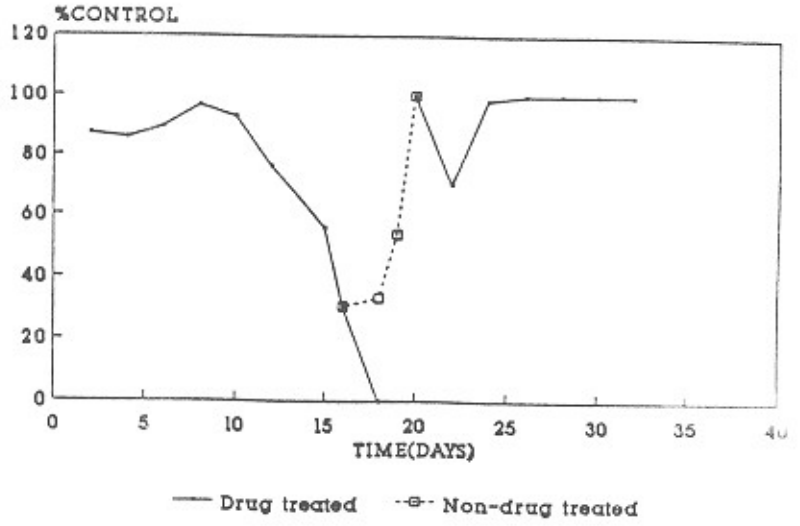
نمودار ۱- طول مدت ایجاد مقاومت در سویه های K_1 و K_1HF_1 به ترتیب،نسبت به غلظت های ۱/۷ و ۲/۵ نانومول در لیتر هالوفانترین



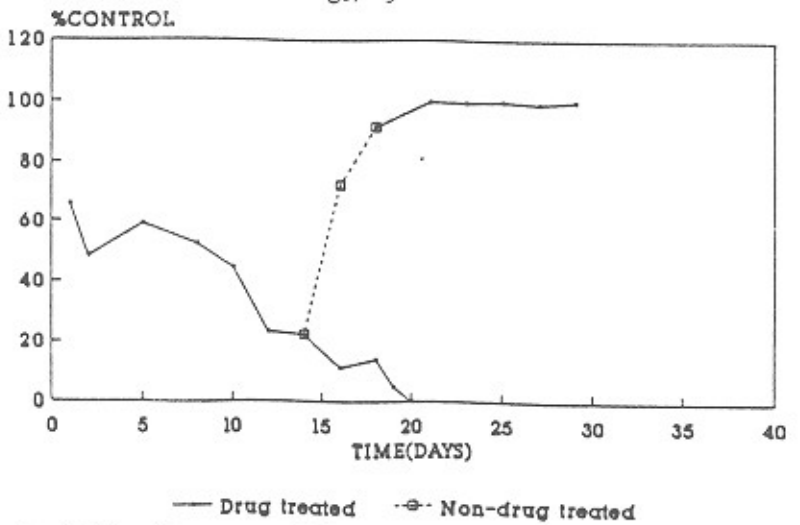
نمودار ۲- طول مدت ایجاد مقاومت در سویه های $T_{9.96}$ و $T_{9.96}HF_1$ به ترتیب ، نسبت به غلظت های ۲/۵ و ۳/۲ نانومول در لیتر هالوفانترین

+ : فنوتیپ گرانولین رده گلبول شده
- : روش بورسی بلیک وسکوپی

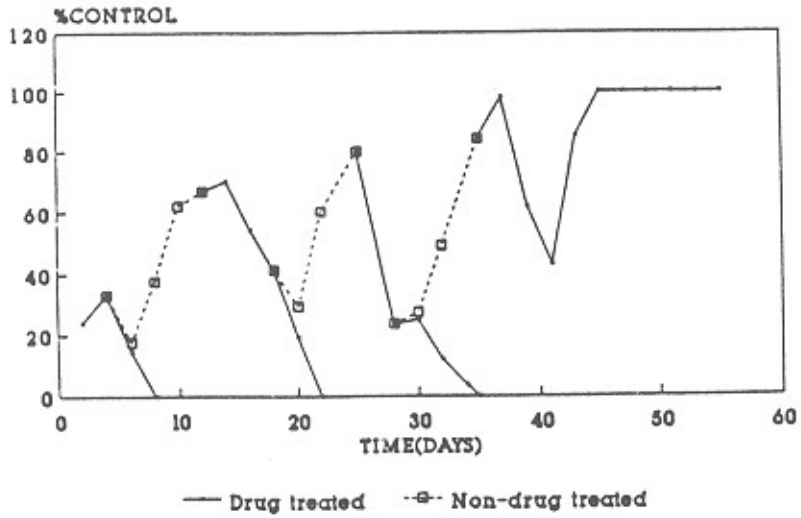
دارو / سویه	K_1HF غلظت مهارکنندگی (IC50) (nmol/l)	K_1 غلظت مهارکنندگی (IC50) (nmol/l)	IC50 (K_1/K_1HF)	$T_{9.96}HF$ غلظت مهارکنندگی (IC50) (nmol/l)	$T_{9.96}$ غلظت مهارکنندگی (IC50) (nmol/l)	IC50 ($T_{9.96}$/$T_{9.96}HF$)
هالوفانترین +	۲۰	۲/۲	۹/۰۹	۲۲	۶/۶	۳/۳۳
هالوفانترین + مفلوکوئین +	۱۸	۱/۹	۹/۴۷	۲۶	۲/۲	۵
مفلوکوئین +	۷۵	۲۹	۲/۵۸	۱۶۶/۶	۵۸/۳	۲/۸۵
مفلوکوئین + سرترالین +	۸۰	۲۶۶/۶	۰/۳۱	۲۹/۳	۳۱	۰/۹۲
کوئینین +	۳۸۶/۶	۱۸۳/۳	۲/۱۰	۱۱۲	۱۶/۶	۱/۲۶
آمودیاکوئین +	۲۳۳	۲۸/۵	۰/۸۱	۱۶/۵	۲۳	۰/۶۸
کینگ هاسو +	۱۴۳	۹/۳	۱/۱۵	۲۰	۱۵	۱/۳۶
پاک ریدهاس +	> ۱۰۰۰	> ۱۰۰۰	-	۵۶	۳۹/۵	۱/۴۷



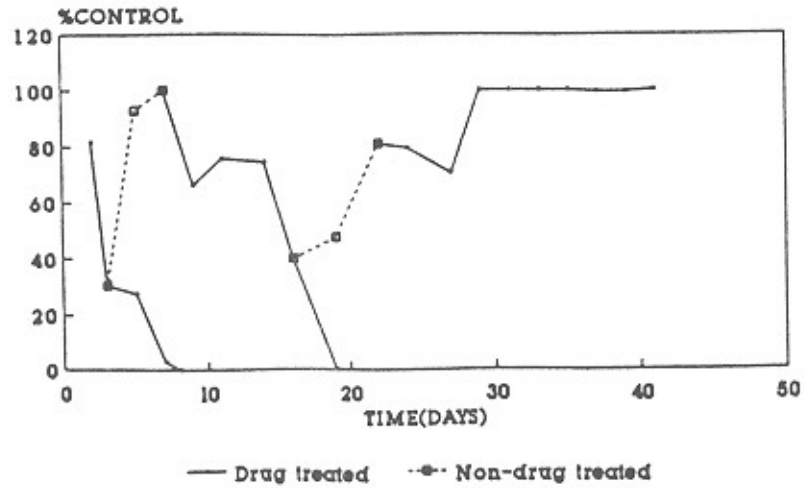
نمودار ۳- طول مدت ایجاد مقاومت، در سویهٔ K_1HF_2، نسبت به غلظت ۳/۲ نانومول در لیتر هالوفانترین



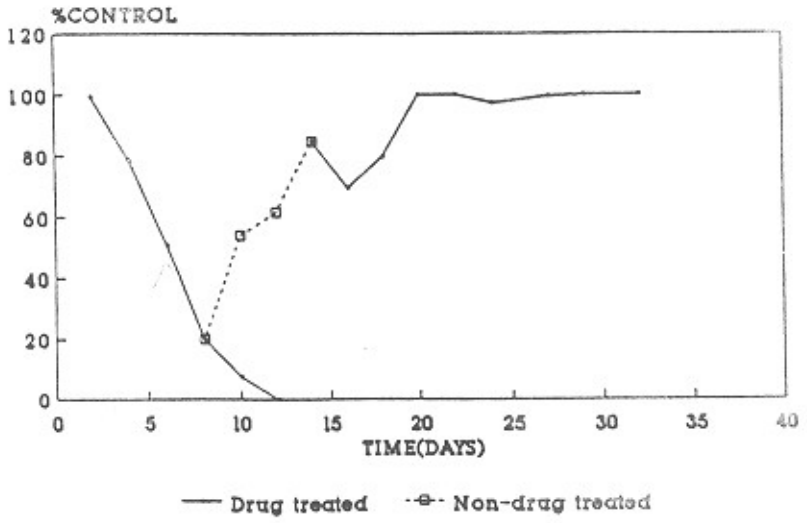
نمودار ۴- طول مدت ایجاد مقاومت، در سویهٔ K_1HF_3، نسبت به غلظت ۴/۵ نانومول در لیتر هالوفانترین



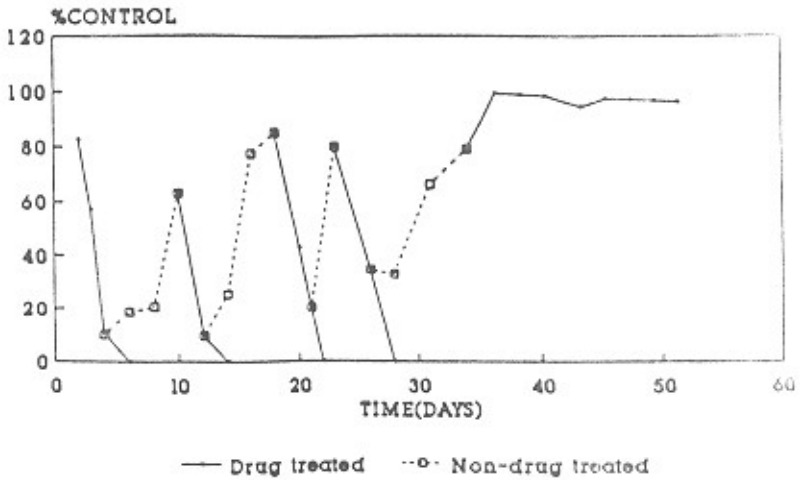
نمودار ۵- طول مدت ایجاد مقاومت، در سویهٔ K_1HF_4، نسبت به غلظت ۸ نانومول در لیتر هالوفانترین



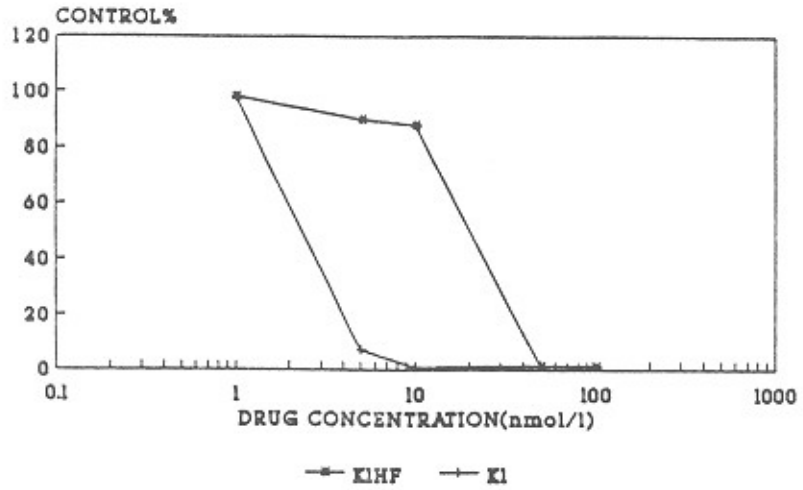
نمودار ۶- طول مدت ایجاد مقاومت، در سویهٔ $T_{9,96}HF_2$، نسبت به غلظت ۴/۵ نانومول در لیتر هالوفانترین



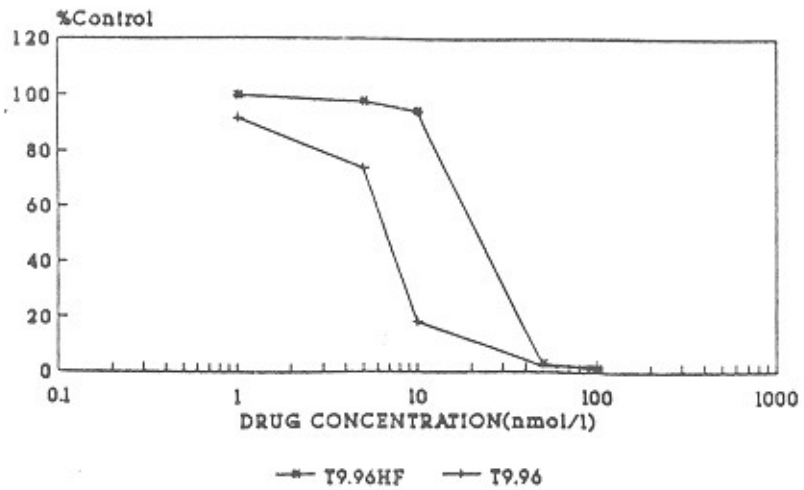
نمودار ۷- طول مدت ایجاد مقاومت در سویه $T_{9.96}HF_3$ نسبت به غلظت ۸ نانومول در لیتر هالوفانترین



نمودار ۸- طول مدت ایجاد مقاومت در سویه $T_{9.96}HF_4$ نسبت به غلظت ۱.۰ نانومول در لیتر هالوفانترین



نمودار ۹- منحنی مقایسه ای تاثیر غلظت های مختلف هالوفانترین در سویه های K_1 و K_1HF با استفاده از [3H] hypoxanthine



نمودار ۱۰- منحنی مقایسه ای تاثیر غلظت های مختلف هالوفانترین در سویه های $T_{9.96}$ و $T_{9.96}HF$ با استفاده از [3H] hypoxanthine

کتابنامه

1- Boudreau, E.F.; Pang, L.W.; Dixon, K.E.; Webster, H.K.; Pavanand, K.; Tosingha, L.; Somutsakorn, P. and Canfield, C.J. (1988): Malaria: Treatment Efficacy of Halofantrine (WR 171, 669) in Initial Field Trials in Thailand. 2- Bull, W.H.O., 66, 227-235.

3- Brockelman, C.R.; Monkolkeha, S. and Tan - ariya, P.(1981): Decrease in Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to Mefloquine in Continuous Culture. Bull. W.H.O., 59, 249-252.

4- Bromm, C. (1989): Human Pharmacokinetics of Halofantrine Hydrochloride. In: Halofantrine. Edited by D.C. Warhurst and C.J. Schofield. Smith Kline and French Laboratories Ltd, U.K.

5- Childs, G.E.; Lambros, C.; Notsch, J.D.; Pamplin, C.L. and Davidson, Jr. D.E. (1984): Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial Activities of 9-Phenanthrene Carbinols. Ann. Trop. Med. Parasitol. 78, 13-20.

6- Cosgriff, T.M.; Boudreau, E.F.; Pampline, C.L.; Doberstyn, E.B.; Desjardins, R.E. and Canfield, C.F. (1982): Evaluation of the Antimalarial Activity of Phenanthrenemethanol Halofantrine (WR 171, 669). Am. J. Trop. Med. Hyg., 31, 1075 - 1079.

7- Desjardins, R.E.; Canfield, C.J.; Haynes, J.D. and Chulay, J.D. (1979): Quantitative Assessment of Antimalarial Activity *In Vitro* by a Semi-automated Microdilution Technique. Antimicrob. Agents Chemother., 16, 710-718.

8- Golenser, J.; Casuto, D. and Pollack, Y. (1981): *Plasmodium falciparum: In Vitro* Induction of Resistance to Aminopterin. Exp. Parasitol., 52, 371-377.

9- Horton, R.J. and Parr, S.N. (1989): Halofantrine: An Overview of Efficacy and Safety. In: Halofantrine. Edited by D.C. Warhurst and C.J. Schofield. Smith Kline and French Laboratories Ltd, U.K.

10- Jensen, J.B. and Trager, W. (1977): *Plasmodium falciparum* in Culture: Use of Outdated Erythrocytes and Description of the Candle-Jar Method. J. Parasitol., 63, 883-886.

11- Lambros, C. and Notsch, J.d. (1984): *Plasmodium falciparum*: Mefloquine Resistance Produced In Vitro. Bull. W.H.O., 62, 433 - 438.

12- Nguyen-Dinh, P. and Trager, W. (1978): Chloroquine Resistance Produced *In Vitro* in and African Strain of Human Malaria. Science, 200, 1397 - 1398.

13- Oduola, A.M.J.; Milhous, W.K.; Weatherly, N.F.; Bowder, J.N. and Desjardins, R.E. (1988): *Plasmodium falciparum:* Induction of Resistance to Mefloquine in Cloned Strains by Continuous Drug Exposure In Vitro. Exp. Parasitol., 67, 354 - 360.

14- Peters, W.; Chance, M.L.; Lissner, R.; Momen, M. and Warhurst, D.C. (1978): The Chemotherapy of Rodent Malaria, XXX: The Enigmas of "NS Line" of *P.berghei*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 72, 23 - 36.

15- Robinson, B.L.; Peters, W. and West, A. (1986): Halofantrine Resistance in *Plasmodium berghei*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80, 343.

16- Rosario, V. (1981): Cloning of Naturally Occurring Mixed Infections of Malaria Parasites. Science, 212, 1037 - 1038.

17- Salako, L.A.; Sowunmi, A. and Walker, O. (1990): Evaluation of the Clinical Efficacy and Safety of Halofantrine in Faliciparum Malaria in Ibadan, Nieria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 84, 644 - 647.

18- Schmidt, L.H.; Crosby, R.; Rasco, J. and Vaughan, D. (1978): Antimalarial Activities of Various 9-Phenan threnemethanols with Special Attention to WR-122, 455 and WR- 171, 669. Antimicrob. Agents Chemother., 14, 292 - 314.

19- Schuster, B.G. and Canfield, C.J. (1989): Preclinical Studies with Halofantrine. In: Halofantrine. Edited by D.C. Warhurst and C.J. Schofield. Smith Kline and French Laboratories Ltd. U.K.

20- Thaithong, S. and Beal, G.H. (1981): Resistance of ten Thai Isolates of *Plasmodium falciparum to* Chloroquine and Pyrimethamine by *In Vitro* Tests. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 271 - 273.

21- Wilson , R.J.M. ; Farrant , J. and Walter , C.A. (1977): Preservation of Intraerythrocytic forms of Malarial Parasites by one-step and two - step Cooling Procedures. Bull. W.H.O., 55, 309 - 315.

22- W.H.O. (1995) : Management of uncomplicated malaria and the use of antimarial drugs for the protection of travellers. W.H.O. , Division of Tropical Diseases, 42 - 45.