



جامعة الموصل
كلية العلوم

دراسة كيموحيوية وجزئية لتأثير مركبي Liposomal
Thalidomide و amphotericin B
والتآزر بينهما لمعالجة اللشمانيا الجلدية والاحشائية
خارج الجسم الحي

نسمة ادريس صالح عبد القادر المعماري

رسالة ماجستير

علوم حياة/ علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور هيثم لقمان شهاب الحياي



جامعة الموصل
كلية العلوم

دراسة كيموحيوية وجزيئية لتأثير مركبي Liposomal
Thalidomide و amphotericin B
والتآزر بينهما لمعالجة اللشمانيا الجلدية والاحشائية
خارج الجسم الحي

رسالة تقدمت بها
نسمة ادريس صالح عبد القادر المعماري

الى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات
شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف
الأستاذ المساعد الدكتور هيثم لقمان شهاب الحياي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ
وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ
بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ

صدق الله العظيم

(سورة المجادلة: الآية: 11)

إقرار المشرف

نشهد أن أعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة الموصل، وهي جزء من متطلبات شهادة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان.

التوقيع:

المشرف: د. هيثم لقمان شهاب الحياي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ: 2022 / /

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن هذه الرسالة الموسومة بـ " دراسة كيموحيوية وجزيئية لتأثير مركبي Liposomal amphotericin B و Thalidomide والتآزر بينهما لمعالجة اللشمانيا الجلدية والاحشائية خارج الجسم الحي " قد قمت بمراجعتها وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم: د.نبهان حسون عبدالله السعدون

المرتبة العلمية: استاذ

التاريخ: 2022 / /

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: د. رائد سالم الصفار

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ: 2022 / /

إقرار رئيس القسم

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل رئيس لجنة الدراسات العليا، أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الاسم: د. رائد سالم الصفار

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ: 2022 / /

قرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة وناقشنا الطالبة
نسمة ادريس صالح المعماري في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2022/5/8 وأنها جديرة لنيل
شهادة الماجستير في اختصاص علوم الحياة/ علم الحيوان.

التوقيع

أ.م.د. محمد بحري حسن عبد السعدون
عضو

التوقيع

أ.د. شهاب احمد يوسف البجاري
رئيس اللجنة

التوقيع

أ.م.د. هيثم لقمان شهاب الحياي
عضو (المشرف)

التوقيع

م.د. ثائر محمد حسن المشهداني
عضو

جامعة الموصل

قرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته..... المنعقدة في / / 2022م وقرر التوصية
بمنحها شهادة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان

عميد الكلية

أ.د. هيام عادل الطائي

التاريخ: / / 2022

مقرر مجلس الكلية

أ.م.د. محمد صبحي حميد

التاريخ: / / 2022

شكر وثناء

اتقدم بفائق الشكر والثناء والامتنان لمن انار لي طريقي وكان نعم الموجه والداعم لي في مسيرة عملي وارفدني بكل ما لديه من علم افادني به (الاستاذ المساعد الدكتور مشرفي المحترم هيثم لقمان الحيايالي). ويعجز اللسان عن الامتنان والثناء والشكر الجزيل لرئاسة قسمنا المحترمة التي تمثل بالاستاذ المساعد الدكتور رائد سالم الصفار المحترم فقد كان مثلاً للأب المساند والمعين لابنائنا امده الله بوافر الصحة والعافية ولا يسعني الا ان اتقدم بالشكر الجزيل والعرفان والامتنان لعمادة كلية العلوم متمثلة بالاستاذ الدكتورة هيام عادل الطائي لما قدمته لنا من دعم ومساندة لتذليل العراقيل كافة التي واجهتنا ولموظفي العمادة كافة ولاسيما قسم الدراسات العليا الذي يتمثل بالدكتورة سينا المحترمة والست غزوة والست عبير متمنية لهم دوام النجاح والموفقية.

وأهدي حصيلة تعبتي ومشقتي هذه الى من يسكنون في روحي ووجداني وقلبي...

* أبي... سر وجودي في الحياة وقودتي ومرشدي ومعلمي الأول رحمك الله تعالى واسكنك فسيح جناته.

* أمي... الشمعة المضيئة في حياتنا رمز الحنان والعطاء والمحبة فليس نجاحي الا برضاها وبفضل دعائها حفظها الله وامدها بتمام الصحة والعافية.

* زوجي (الاستاذ طالب المعماري)... سندي وقوتي وقت ضعفي إذ كان المشجع الأول لاكمال ما بدأت في مسيرتي العلمية وتحقيق حلمي الذي طالما كنت اجدته مستحيلاً وشاركني تعبتي وسهرتي فكان نعم رفيق للدرب وفقه الله تعالى واتمنى له النجاح الدائم والموفقية.

* اولادي... فلذة كبدي وقرّة عيني ومن هم جزء مني فكانوا نعم الاولاد وفقهم الله تعالى وانار دربهم ويسر امورهم وحفظهم من كل مكروه الملازم الحقوقي عبدالكريم والدكتور الصيدلاني محمد.

* اخوتي... واخص بالذكر اخي الشهيد محمد الذي كان دمه سبب في تحقيق حلمي اهدي كل حرف صدقة جارية على روحه الطاهرة اسكنه الله فسيح جناته. والى اخي صالح والدكتور عمر ويحيى وصلاح من اشدّد بهم ازري واتكئ عليهم وقت شدتي ومن كانوا معي في السراء والضراء يداً بيد.

* اخواتي... اللواتي كانتا لي الصدر الحنون ومنبع الدفء والمواساة في كل زمان ومكان فكانتا نعم السند والعون وفقهم الله تعالى وحفظهم (ذكرى ويسرى) وازواجهم (شامل وبشار) واولادهم واخواتي اللاتي لم تلهيهم امي فعلاً وقولاً زوجات اخوتي (نور - سهى - رند) واولادهم حفظهم الله تعالى.

* زملائي... في مختبر الصحة العامة واخص بالذكر الأخ نزار حسن والاخ محمد عبد الهادي وفي مستشفى البتول التعليمي ومصرف الدم الاخ صدام خليل والاخلة العزيزة أمل موفق حفظهم الله تعالى وجزاهم عني خير الجزاء.

* وشكري وعرفاني لكل من اسهم ولو بمعلومة بسيطة او توجيه في اخراج هذا العمل الى النور.

اليكم جميعاً أهدي ربيع حروفي وشذى كلماتي

الخلاصة

تناولت هذه الدراسة تحديد التأثير السمي لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب
والثاليدومايد والتأزر بينهما على بروماستكوت *Promastigote* للشمانيا الجلدية *L. tropica*
والشمانيا الاحشائية *L. donovani* وايجاد التركيز القاتل لـ 50% (IC₅₀) Inhibition
Concentration و 90% (IC₉₀) عند الطور اللوغاريتمي 72 ساعة.

وقد تراوحت التراكيز المثبطة لـ 50% من النمو لعقار الثاليدومايد ما بين (10-12.5)
مايكروغرام/مل وللامفوترسين اللايبوسومي ب (5) مايكروغرام/مل والتراكيز المثبطة لـ 90% من
النمو لعقار الثاليدومايد ما بين (25-30) مايكروغرام/مل وللامفوترسين ما بين (20-25)
مايكروغرام/مل لكل من الشمانيا الجلدية والاحشائية وكان تركيز التأزر بين العقارين لكلا النوعين لـ
50% تثبيط لنمو كلا النوعين من الطور المسوط عند الطور اللوغاريتمي 72 ساعة (0.5 + 2.5)
و (2 + 2.5) مايكروغرام/مل.

كما درس عدد وزمن الجيل للعقارين والتأزر بينهما، إذ أدت زيادة التراكيز الى خفض عدد
الجيل بواقع (0.52-3.98) جيل لبروماستكوت الشمانيا الجلدية و (0.25-4.19) جيل لبروماستكوت
الشمانيا الاحشائية لكلا العقارين و (1.89-5.69) جيل لبروماستكوت الشمانيا الجلدية
و (1.40-5.80) جيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية للتأزر بين العقارين عند الفترات
(24، 48، 72، 96) ساعة.

ولحظ ظهور زيادة في زمن الجيل مع ازدياد التراكيز المستخدمة للعقارين مع ازدياد فترة
التعريض فقد تراوحت ما بين (24-68) ساعة بالنسبة للشمانيا الجلدية و (22-65) ساعة للشمانيا
الاحشائية وكان زمن الجيل للتأزر بين العقارين بواقع (12-17) ساعة للشمانيا الجلدية و (11-18)
ساعة للشمانيا الاحشائية.

ووجد تأثير واضح للأدوية المستخدمة والتأزر بينهما على المظهر الخارجي وحدوث تغير في
الشكل العام للطفيلي من المغزلي الى البيضوي، الكروي، وغير المنتظم او المتحلل وتغير شكل السوط
او حتى فقده.

حددت سمية العقارين باجراء فحص تحديد الجرعة المميتة الوسطية على الجرذان البيضاء
البالغة نوع Albino وقد بلغت لعقار الثاليدومايد 4870 ملغم/كغم وللمضاد الامفوترسين
اللايبوسومي ب 3322 ملغم/كغم وكانت نتيجة الدمج بين العقارين للثاليدومايد 3274 وللامفوترسين
1887 ملغم/كغم.

بالنسبة للمستوى الجزيئي فقد درس تأثير الادوية المستخدمة على عدد من المورثات للنوعين من الطفيلي عند الطور اللوغاريتمي اذ اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنتائج تضخيم السلسلة الداخلية المستنسخة (ITS1) Internal Transcribed Spacer1 للشمانيا الجلدية والاحشائية كليهما توافق مع الحزم الرئيسية للعينات جميعها المستخدمة الجلدية T (C، 5، 10، 2.5+0.5، 2.5+2) والاحشائية D (C، 5، 12.5، 2.5+1، 2.5+2) مايكروغرام/ مل المعاملة وغير المعاملة (السيطرة) عند الحزمة القياسية 322bp (Base pair) مما يدل على انها تعود الى جنس الشمانيا.

ظهر من الترحيل الكهربائي لنتائج تضخيم موروث الـ Kinetoplastid Membrane Protein (KMP11) وجود تباين وراثي في الحزم (4، 5) لطفيلي الشمانيا الجلدية و(9، 10) لطفيلي الشمانيا الاحشائية أي حدوث تثبيط من الأدوية المتأثرة مما يدل على الحد من عملية تضخيم الجسم الحركي ونمو الخلايا والحد من حركتها وتقليل اعداد الطور المسوط.

ظهر من نتائج الترحيل الكهربائي لتضخيم موروث (ND1) NADH Dehydrogenase1 الى وجود تباين وراثي في الحزم رقم (4، 5) و(9، 10) لنوعي الشمانيا الجلدية والاحشائية على التوالي مما يدل على أن تأثير الادوية المتأثرة كان على عملية انتاج الطاقة نتيجة لذلك قلت فعالية الطفيلي او قد حدث تثبيط للايض الخلوي للمايتوكونديريا ومن ثم الحد من تكاثرها واعدادها.

حسب النتائج التي تم الحصول عليها وجدت تباينات وراثية ظهرت في نماذج برماستكوت الشمانيا الجلدية لثلاث نماذج معاملة بالأدوية. ومن الجدير الذكر بان الشكل التطوري للمعاملات الدوائية جميعها ونماذج السيطرة قد ثبت بالشكل الشجري وجود بعض التوافقات ووجود تغيرات جينية والتي سجلت في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الاحيائية National Center Botechnology Information (NCBI) لطفيلي الشمانيا الجلدية. مما دل على أن تأثير العلاج التآزري كان ناجحاً في تثبيط نوعي الشمانيا والحد من نموها فضلا عن عد المورثات Kinetoplastid Membrane Protein (KMP11) و (ND1) NADH Dehydrogenase1 هدفا جيدا للتأثيرات العلاجية.

ثبت المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
I	الخلاصة	
III	ثبت المحتويات	
VIII	ثبت الجداول	
XI	ثبت الاشكال	
XIII	ثبت المصطلحات	
XVI	ثبت المختصرات	
4-1	المقدمة Introduction	
34-5	استعراض المراجع Literature review	
5	جنس اللشمانيا	1-2
6	تصنيف اللشمانيا	2-2
7	الشكل ودورة الحياة	3-2
7	الطور غير المسوط	1-3-2
7	الطور المسوط	2-3-2
8	دورة حياة طفيلي اللشمانيا	3-3-2
9	انواع داء اللشمانيا والعلامات السريرية المصاحبة لها	4-2
9	داء اللشمانيا الجلدي	1-4-2
11	داء اللشمانيا المنتشر	2-4-2
11	داء اللشمانيا المخاطي الجلدي	3-4-2
12	داء اللشمانيا الاحشائي	4-4-2
14	اللشمانيا والتوزيع الجغرافي لها	5-2
15	داء اللشمانيا في العراق	6-2
16	تشخيص اللشمانيا	7-2
16	التشخيص المختبري	1-7-2
17	عزل وتنمية الطفيلي خارج وداخل الجسم الحي	2-7-2
17	الاستجابة المناعية	3-7-2
17	الكشف عن الاجسام المضادة	4-7-2
17	التشخيص الجزيئي	5-7-2

الصفحة	الموضوع	التسلسل
17	تقنيات كيموحيوية بتحليل النظير الانزيمي	6-7-2
17	المعالجة لداء الشمانيا	8-2
18	الانتيمون الخماسي التكافؤ	1-8-2
19	البنتاميدين	2-8-2
20	بارومومايسين	3-8-2
21	ملتيفوسين	4-8-2
22	الامفوترسين ب	5-8-2
22	الامفوترسين اللايبوسومي ب	6-8-2
23	عقار الثاليدومايد	7-8-2
25	المسارات المستهدفة	9-2
26	تفاعلات سلسلة البلمرة	10-2
26	المكونات الأساسية لتفاعل البلمرة PCR	1-10-2
26	DNA القالب	1-1-10-2
27	البادئات	2-1-10-2
27	انزيم البلمرة	3-1-10-2
28	النيوكليوتيدات الثلاثية الفوسفيت منقوصة الاوكسجين	4-1-10-2
28	الايونات الموجبة ثنائية التكافؤ	5-1-10-2
28	المحاليل المنظمة	6-1-10-2
28	المبلر الحراري	7-1-10-2
29	مراحل تفاعل البلمرة	2-10-2
29	مرحلة المسخ	1-2-10-2
29	مرحلة الارتباط	2-2-10-2
29	مرحلة الاستطالة	3-2-10-2
30	عدد الدورات	3-10-2
31	المورثات وتباين التعبير المورث	11-2
31	مورثات الشمانيا	12-2
32	المورث المشفر <i>KMPII</i> Kinetoplastid Membrane Protein	1-12-2
32	المورث المشفر <i>ND1</i> . NADH (Nicotinamide Adenine	2-12-2

الصفحة	الموضوع	التسلسل
	Dinucleotide) Dehydrogenase	
33	<i>ITS1-IS</i> Internal transcribed spacer1 السلسلة الداخلية المستنسخة	3-12-2
48-35	المواد وطرق العمل Materials and Methods	
35	الأجهزة المستعملة	1-3
36	الكائنات المستخدمة	2-3
36	تحضير الوسط الزراعي	3-3
36	الأوساط الزراعية وسط توبي	1-3-3
37	مصدر الدم	2-3-3
37	تحضير الوسط كاملاً	3-3-3
38	تنمية وحسابات البروماستكوت اللشمانيا بنوعيهما اللشمانيا الجلدية واللشمانيا الاحشائية	4-3
38	تحضير معلق الطفيلي	5-3
38	تحضير تراكيز الادوية المستخدمة	6-3
38	تحضير عقار الـ (Thalidomide (Thalix - 100	1-6-3
39	تحضير عقار الـ Liposomal Amphoteric B (Ambisome)	2-6-3
39	تحضير العقارين بصورة تأزرية	3-6-3
39	تأثير العقارين على نمو وزمن الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية	7-3
40	صبغ الطفيلي	8-3
40	تحضير الصبغة	1-8-3
41	طريقة الصبغ	2-8-3
41	طريقة تحضير المحلول المنظم	3-8-3
41	تأثير كل من عقار الـ الامفوترسين الـ لايبوسومي ب وعقار الـ الثاليدومايد على مورثات بروماستكوت اللشمانيا	9-3
41	استخلاص الحمض النووي (Deoxyribonucleic Acid (DNA	1-9-3
42	تقرير نقاوة وتركيز DNA	2-9-3
42	استخلاص الحمض النووي من الهلام	3-9-3
43	تحضير هلام الاكاروز وعملية الترحيل الكهربائي لـ DNA	4-9-3

الصفحة	الموضوع	التسلسل
43	Polymerase Chain Reaction (PCR) تفاعلات الـ	5-9-3
44	التشخيص الجزيئي لطفيلى الشمانيا بالاعتماد على منطقة 18rRNA لمورث <i>KMPH</i>	6-9-3
45	التشخيص الجزيئي لطفيلى الشمانيا بالاعتماد على منطقة 18rRNA لمورث <i>NDI</i>	7-9-3
46	التشخيص الجزيئي لطفيلى الشمانيا بالاعتماد على منطقة 18rRNA لسلسلة <i>ITS1 - 1S</i>	8-9-3
47	تحديد تتابع النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية الـ DNA Sequencing	9-9-3
47	تحديد سمية LD ₅₀ داخل الجسم الحي	10-3
48	التحليل الاحصائي	11-3
101-49	النتائج والمناقشة Results and Discussion	
49	تحديد الطور اللوغارتمى	1-4
51	تأثير عقار الثاليدومايد في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	2-4
54	تأثير عقار الثاليدومايد في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	3-4
58	تأثير عقار الامفوترسين اللايوسومى ب في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	4-4
62	تأثير عقار الامفوترسين اللايوسومى ب في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	5-4
67	التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايوسومى ب والثاليدومايد عند تثبيت تركيز الامفوترسين عند 2.5 مايكروغرام/ مل في نمو الجيل وعده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية	6-4
73	التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد والامفوترسين اللايوسومى ب عند تثبيت تركيز عقار الثاليدومايد عند 2.5 مايكروغرام/ مل في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية	7-4
81	تأثير الثاليدومايد والامفوترسين اللايوسومى ب والتآزر بينهما في الشكل الخارجى لبروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية	8-4

الصفحة	الموضوع	التسلسل
85	تحديد سمية الادوية المستخدمة	9-4
85	تحديد الجرعة المميتة الوسطية LD ₅₀ لعقار الثاليدومايد في الجرذان البالغة البيضاء باستخدام طريقة الصعود والنزول وذلك عن طريق التجريع بالفم	1-9-4
86	تحديد الجرعة المميتة الوسطية LD ₅₀ لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في الجرذان البيضاء البالغة باستخدام طريقة الصعود والنزول وذلك عن طريق الحقن بالخلب	2-9-4
87	تحديد الجرعة المميتة الوسطية LD ₅₀ للتأزر بين العقارين في الجرذان البالغة والبيضاء	3-9-4
92	تأثير عقار الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب والتأزر بينهما في سلسلة <i>ITS1</i> لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية	10-4
95	تأثير عقار الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب والتأزر بينهما في مورث <i>KMP11</i> لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية	11-4
97	تأثير عقار الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب والتأزر بينهما في بروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية على مورث <i>ND1</i>	12-4
99	النمط الظاهري الشجيري	13-4
102	الاستنتاجات والتوصيات	
133-103	المصادر	
A-B	الخلاصة الانكليزية	

ثبت الجداول

الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1	الأجهزة المختبرية المستعملة	35
2	الوسط الصلب	36
3	الوسط السائل	37
4	تسلسل القواعد النتروجينية لمورث <i>KMPH</i>	44
5	برنامج الـ PCR الخاص بتضخيم لمورث <i>KMPH</i>	44
6	تسلسل القواعد النتروجينية لمورث <i>ND1</i>	45
7	برنامج الـ PCR الخاص بتضخيم لمورث <i>ND1</i>	45
8	تسلسل القواعد النتروجينية للسلسلة الداخلية المستنسخة <i>ITS1</i>	46
9	برنامج الـ PCR الخاص بتضخيم السلسلة الداخلية المستنسخة <i>ITS1</i>	46
10	عدد بروماستكوت (10^6) لطيفلي الشمانيا الجلدية والاحشائية ولفترات زمنية مختلفة عدد البروماستكوت المبدوء به (10^5)	49
11	تأثير عقار الثاليدومايد في نمو بروماستكوت طيفلي الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> (خلية $10^6 \times$)	52
12	تأثير عقار الثاليدومايد في عدد الجيل لبروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	53
13	تأثير عقار الثاليدومايد في زمن الجيل لبروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	53
14	تأثير عقار الثاليدومايد في نمو بروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> (خلية $10^6 \times$)	55
15	تأثير عقار الثاليدومايد في عدد الجيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	56
16	تأثير عقار الثاليدومايد في زمن الجيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	56
17	تأثير عقار الامفوترسين اللايوسومي ب في نمو بروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> (خلية $10^6 \times$)	60
18	تأثير عقار الامفوترسين اللايوسومي ب في عدد الجيل لبروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	61

الصفحة	عنوان الجدول	الجدول
61	تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب <i>L. tropica</i> في زمن الجيل لبروماستكوت الشمانيا الجلدية	19
63	تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب B في نمو بروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> (خلية $\times 10^6$)	20
64	تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب B في عدد الجيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	21
64	تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب B في زمن الجيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	22
69	التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب والثاليدومايد بعد تثبيت عقار الامفوترسين اللايبوسومي عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الثاليدومايد في نمو بروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> (خلية $\times 10^6$)	23
70	التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب والثاليدومايد بعد تثبيت عقار الامفوترسين اللايبوسومي عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الثاليدومايد في نمو بروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> (خلية $\times 10^6$)	24
71	التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في عدد الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على بروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. tropica</i>	25
71	التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في عدد الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على بروماستكوت الشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	26
72	التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في زمن الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على بروماستكوت الشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	27
72	التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في زمن الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على	28

الصفحة	عنوان الجدول	الجدول
	بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	
75	التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب في نمو بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. tropica</i> (خلية $\times 10^6$)	29
76	التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب في نمو بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> (خلية $\times 10^6$)	30
77	التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في عدد الجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	31
77	التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في عدد 71 لجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	32
78	التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في زمن الجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	33
78	التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في زمن الجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	34
86	الجرعة المميطة الوسطية لعقار الثاليدومايد Thalidomide	35
87	الجرعة المميطة الوسطية لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب Liposomal amphotericin B	36
88	الجرعة المميطة الوسطية للتأزر بين العقارين الثاليدومايد Liposomal وThalidomide والامفوترسين اللايبوسومي ب amphotericin B	37

ثبت الاشكال

الصفحة	عنوان الاشكال	الشكل
7	تصنيف أنواع اللشمانيا	1
8	أطوار طفيلي اللشمانيا	2
9	دورة حياة طفيل اللشمانيا	3
10	داء الشمانيا الجلدي	4
11	داء الشمانيا الجلدي المنتشر	5
12	داء الشمانيا المخاطي الجلدي	6
13	داء الشمانيا الاحشائي	7
15	انتشار داء اللشمانيا في العالم	8
18	الصيغة الكيميائية للمركبات الانتيمونالية	9
20	الصيغة الكيميائية لعقار البنتاميدين	10
20	الصيغة الكيميائية لعقار البارامايسين	11
21	الصيغة الكيميائية لعقار المليفوسين	12
22	الصيغة الكيميائية لعقار الامفوترسين ب	13
24	الصيغة الكيميائية لعقار الثاليدومايد Thalidomide	14
27	القواعد النتروجينية	15
30	مراحل تفاعل البلمرة	16
50	منحنى نمو بروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i>	17
50	منحنى نمو بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i>	18
82	بروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> غير المعاملة	19
82	بروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> المعاملة IC_{50} بالثاليدومايد	20
82	بروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> المعاملة IC_{50} بالامفوترسين اللايوسومي ب	21
82	بروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> المعاملة بالتأزر IC_{50} (بتثبيت الامفوترسين ب)	22
82	بروماستكوت اللشمانيا الجلدية <i>L. tropica</i> المعاملة بالتأزر IC_{50} (بتثبيت الثاليدومايد) Thalidomide	23
83	بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> غير المعاملة	24

الصفحة	عنوان الاشكال	الشكل
83	بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> المعاملة IC_{50} بالثاليدومايد Thalidomide	25
83	بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> المعاملة IC_{50} بالامفوترسين اللايبوسومي ب Liposomal amphotericin B	26
83	بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> المعاملة بالتأزر IC_{50} (بتثبيت الامفوترسين ب) Liposomal amphotericin B	27
83	بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية <i>L. donovani</i> المعاملة بالتأزر IC_{50} (بتثبيت الثاليدومايد) Thalidomide	28
93	استخلاص الحمض النووي DNA من عينات طفيلي اللشمانيا	29
93	الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم سلسلة <i>ITS1</i> لطفيلي اللشمانيا وبناتج تفاعل و 316 في <i>L. donovani</i> 322bp في <i>L. tropica</i>	30
95	الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم مورث <i>KMPH</i> لطفيلي اللشمانيا بحجم 470bp	31
97	الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم مورث <i>ND1</i> لطفيلي اللشمانيا بحجم 113bp	32
99	العلاقة بين سلالات اللشمانيا الجلدية والاحشائية <i>L. donovani</i> و <i>L. tropica</i> ضمن المخطط الشجري اعتماداً على سلسلة <i>ITS1</i>	33

ثبت المصطلحات

Leishmaniasis	داء اللشمانيا
Neglected tropical diseases	الأمراض الاستوائية المهملة
Cutaneous Leishmaniasis	داء اللشمانيا الجلدي
Diffuse Cutaneous Leishmaniasis	داء اللشمانيا الجلدي المنتشر
Immunodeficiency disease	مرض نقص المناعة
Espundia	داء اللشمانيا المخاطي الجلدي
Visceral Leishmaniasis	داء اللشمانيا الاحشائية
Macrophages	الخلايا البلعية البيضاء
Mucocutaneous Leishmaniasis	داء اللشمانيا المخاطي الجلدي
Post Kala – azar Dermal Leishmaniasis	داء اللشمانيا الجلدي ما بعد الكلازار
Erythema Nodosum Leprosum	داء الجذام الحمامي العقدي
Behchets Disease	مرض بهجت
Amastigote	الطور غير المسوط
Promastigote	الطور المسوط
Flagellar Pocket	محفظة سوطية
Longitudinal Fission	الانشطار الطولي
Binary Fission	الانشطار العرضي
Masal Septum	الحاجز الانفي
Extracellular	خارج الخلية الحية
Intracellular	داخل الخلية الحية
Phagocytosis	الخلايا الملتهمة
Hypostome	خرطوم الحشرة
Black Fever	الحمى السوداء
Macular	طفح بقعي
Self – Healing	شفاء ذاتي
Systemic Visceral Leishmaniasis	داء اللشمانيا الحشوي الجهازى
Malnutrition	سوء التغذية

Leishmaniasis	داء اللشمانيا
Pentavalent Antimony	الانتيمون الخماسي التكافؤ
Pancreatitis	التهاب البنكرياس
Cardio toxicity	سمية القلب
Hepatotoxicity	سمية الكبد
Arrhythmia	عدم انتظام دقات القلب
Nephrotoxicity/ Renal toxicity	تسمم الكليتين
Myalgia	الم العضلات
Chemotherapy	المعالجة الكيميائية
Pneumocystis (Jirovecii)	المتكيسة الرئوية
Diabetes Mellitus	داء السكر
Hypoglycemia	نقص السكر
Hypotension	انخفاض ضغط الدم
Tachycardia	تسارع نبض القلب
Teratogenicity	تشوهات خلقية
Apoptosis	الموت المبرمج
Depolarization	ازالة الاستقطاب
Antifungal	مضاد فطري
Hypokalemia	نقص البوتاسيوم
Phospholipids	الليبيدات المفسفرة
Target	المستهدفة
Macrophages Hepatic	البلعمة الكبدية
Tumour Necrosis Factor	عامل النخر الورمي
Aphthous Ulceration	التقرح القلاعي
Oral Bullous	الفقاع الفموي
Mucous Menbrane Disorders	تقرح الغشاء المخاطي
Polymerase Chain Reaction	تفاعل سلسلة البلمرة
Mutations	الطفرات
Primers	البادئات

Leishmaniasis	داء اللشمانيا
Oligonucleotide	نيوكليوتيدات قصيرة
Denaturation	المسخ
Amplification	تضخيم
Thermo cycler	المبلمر الحراري
Annealing	الارتباط
Extension	الاستطالة
Heterogeneity	تباين المورثات
Genes Expression	تعبير المورثات
Immunotherapy	العلاج المناعي
Immunization	التحصين
Cytotoxic	السموم الخلوية
Trypanosomata	المتقبيات
Antibiotics	المضادات الحيوية
Electrophoresis	الترحيل الكهربائي
Ladder DNA	الدليل الحجمي الجزيئي
Lethal Dose	الجرعة المميتة
Log Phase	الطور اللوغارتمي
Antibacterial	مضادات البكتريا
Synergism	التآزر
Degeneration	الانحلال
Phenotype	النمط الظاهري
Shrinkage	انكماش
Permeability	نفاذية

ثبت المختصرات

المختصر	المصطلح بالإنكليزية
Am Bisome (LAmB)	Liposomal Amphotericin – B
AmB	Amphotericin B
ATP	Adenosine Triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basepair
CB	Cell-lysis Buffer
CDK	Cycline – Dependent Kinase
CL	Cutaneous Leishmaniasis
DL	Diffuse Leishmaniasis
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELQS	Endochin-like quinolones
ENL	Erythema Nodosum Leprosum
HASPB	Hydrophilic Acylated Surface Protein B.
HIV	Human Immuno Virus
IC	Inhibition Concentration
IM	Intramuscular
<i>ITS1</i>	Internal Transcribed Spacer 1
IV	Intravenous
<i>KMP II</i>	Kinetoplastid Membrane Proten II
LC ₅₀	Lethal Concentration (50%)
LC ₉₀	Lethal Concentration (90%)
M	Marker
MCL	Mucocutaneous
mRNA	Messenger Ribonucllic Acid

المختصر	المصطلح بالإنكليزية
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase
NCBI	National Center Biotechnology Information
<i>ND1</i>	NADH Dehydrogenase 1
NK	Natural Killer
NNN medium	Novy: Nicoll: Mac Neal Medium
NTD	Neglected Tropical Disease
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKDL	Post Kala – azar Dermal
PLGA	Pegylated Polylactic Polyglycolic acid copolymer
PPI	Protein Protein interaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RMRI	Rajendra Memorial Research Institute
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
Sb	Sodium Stibogluconate
SSG	Sodium Stibogluconate
TM	Melting Temperature
TNF - α	Tumour Necrosis Factor – alpha
TryR	Trypanothione Reductase
VL	Visceral Leishmaniasis
WHO	World Health Organization

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

الفصل الاول

المقدمة Introduction

يعد داء اللشمانيا من الأمراض الطفيلية الحيوانية التي يسببها طفيلي اللشمانيا، ويحدث داء اللشمانيا وينتشر في أغلب المناطق المدارية او شبه المدارية وصنف من ضمن الأمراض الاستوائية المهملة (Neglected tropical diseases (NTD) (Alemayehu and Alemayehu, 2017). اعتبر داء اللشمانيا من ضمن الأمراض الأكثر انتشاراً في قارة اسيا وأفريقيا وأمريكا (Pigotti et al., 2014). يعود طفيلي اللشمانيا الى رتبة Kinetoplastida وينتمي لعائلة Trypanosomatidae (Auwera and Dujardin, 2015). وعد من الأمراض الطفيلية التي تنتقل الى الانسان وبقيّة اللبائن كالفواض والكلاب عن طريق لسعة انثى ذبابة الرمل من جنس *Phlebotomus* اذ يوجد أكثر من 30 نوع من هذه الذبابة التي تُعد العامل الرئيس الناقل للطفيلي وحوالي 20 نوع من الطفيلي الممرض وما يقرب من 350 مليون شخص معرضين لخطر الإصابة بداء اللشمانيا سنوياً. وهناك 12 مليون شخص مصاب ويسجل حالات جديدة 2 مليون إصابة سنوياً (Inceboz, 2019; Mann, 2021).

وداء اللشمانيا من الأمراض التي تنتقل داخل الخلية الحية وصنف من ضمن التسعة امراض الاستوائية المهمة في قارات العالم جميعها (Torres-Guerrero et al., 2017). وتوجد أربعة أنواع من اللشمانيا وهي تتشابه في الشكل الخارجي ولكنها تختلف في كثير من الصفات ومنها امكنة تواجدها وانتشارها وصنفت بحسب تركيبها والعلامات السريرية واماكن الإصابة والانسجة المصابة.

داء اللشمانيا الجلدي: الذي يعد من أكثر الأنواع شيوعاً وانتشاراً في العالم اذ تصل الاصابات فيه الى ما يقارب 90% من الحالات وتسببه كل من *L. maxicana* و *L. venzeulensis* و *L. major* و *L. tropica* و *L. braziliensis* و *L. aethiopica*.

تكون المناطق المكشوفة أكثر عرضة للإصابة بلسعة انثى ذبابة الرمل ولاسيما الوجه والأطراف اذ تظهر بشكل لسعة وبعد ذلك تتطور لتتحول الى قرحة وقد يصاحبها اصابات ثانوية بالبكتريا. فتتخلف ندباً من بعد شفائها وتنتقل بوساطة انثى ذبابة الرمل من جنس *Phlebotomus papatasi* (Inceboz, 2019; Scott and Novais, 2016).

داء اللشمانيا الجلدي المنتشر: يعد من الأشكال النادرة الحدوث للإصابات الجلدية وغالباً ما يسببها طفيلي اللشمانيا نوع *L. venzeulensis* و *L. amazonensis* في العالم الحديث وان الاشخاص المصابين بأمراض نقص المناعة Human Immunodeficiency

Virus (HIV) أكثر عرضة من غيرهم للتعرض للإصابة بهذا النوع ولكنها لا تغزو الجهاز العصبي فأصابتها غير جهازية وإنما تترك أثرا (Freites et al., 2018; Hashignchi et al., 2016).

داء اللشمانيا المخاطي الجلدي: سمي هذا النوع من الإصابة بـ *Espundia* ويسبب إصابة لكل من الأنف، البلعوم، الفم، الحاجز الأنفي، الحنجرة، الحنك والغشاء المخاطي البلعومي (Cincura et al., 2017). تسبب تشوه في المناطق المصابة وتسببها *L. braziliensis* و *L. panamensis* ويمكن تمييزها بالفحوصات الجزيئية وفحوصات الأجسام المضادة أحادية المنشأ (Abadias-Granado et al., 2021).

اللشمانيا الاحشائية: يُعد هذا النوع قاتلاً للإنسان بنسبة 95% إذا لم يعالج مباشرة بعد الإصابة وتسببه كل من *L. infantum* و *L. donovani* و *L. chagasi* وتسمى بالكلازار او الحمى السوداء. يُصيب الطفيلي الخلايا البلعمية البيضاء Macrophages وتقل هذه الخلايا الطور غير المسوط الى الكبد او الطحال او نخاع العظم وتسبب تضخماً فيها فضلاً عن فقدان الوزن وارتفاع في درجات الحرارة (Nampoothiri et al., 2016 ; Zacarias et al., 2017). في بعض الحالات تحدث إصابة جلدية ما بعد الحشوية وتسمى (PKDL) Post Kala-azar Dermal Leishmania بعد العلاج على شكل طفح جلدي ويشخص باستخدام تقنية الـ PCR (Gedda et al., 2020; Zijlstra, 2016).

اكتشف الباحثون علاجات عديدة لطفيلي اللشمانيا وبأنواعها كافة لاسيما الجلدية والاحشائية ومع هذا فان الأدوية المستخدمة لعلاج هذا الطفيلي محدودة لسميتها وتكلفتها العالية وطول مدة العلاج فضلاً عن الآثار الجانبية التي تخلفها خلال فترة العلاج او بعدها مثال على ذلك مركبات الانتيمون خماسية التكافؤ التي تعد الخط الأول لعلاج اللشمانيا وتسبب اثرا ضارة وخطيرة مما يؤدي الى عدم الالتزام بالعلاج والتخلي عنه ليؤدي الى ظهور سلالات مقاومة للعدوى (Menezes et al., 2015).

وتم استخدام الامفوترسين ب والبنتاميدين اللذان يستعملان كمضادين للعدوى الفطرية الجهازية كخط ثاني لعلاج اللشمانيا ولكن بقي استخدامها محدودة بسبب سميتها العالية للعائل وظهور اصناف مقاومة (Paladi et al., 2017).

استخدم الميلتيفوسين علاجاً يعطى للمصابين بالأمراض السرطانية واثبتت فعالية عالية تجاه طفيلي اللشمانيا الجلدية والاحشائية وحتى المخاطية الجلدية وهو علاج فموي ولكنه أصبح محدود الاستعمال بعد ثبات سميته تجاه الجهاز الهضمي وقد اثبتت بعض الدراسات ان للدواء تأثيرات سمية في اثناء التطور الجنيني وتكوين الأعضاء (Monge-Maillo and Lopez-Velez., 2015).

وللحاجة الماسة لعلاجات جديدة فقد تم اختيار عقار الثاليومايد الذي ظهر في ستينيات القرن الماضي كمهدئ للحوامل. يمتلك العقار العديد من الاسماء التجارية ويعد من مركبات الفا-كلوتاميك اسيد (Chobrial *et al.*, 2003). أيضا له فاعلية عالية في علاج الاشخاص الذين يعانون من داء الجذام الحمامي العقدي المتكرر (ENL) Erythema Nodosum Leprosum ويعد علاجاً فعالاً فعال للتعبير الجيني الانتقائي لنخر الورم بواسطة العامل Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) ولعلاج تلف الاعصاب المصاب لمرض الجذام الحمامي اذ يعد كمضاد للالتهابات (Upputuri *et al.*, 2020) وأيضاً لوحظ استخدام الثاليومايد في علاج امراض نقص المناعة الذاتية مثل التهاب المفاصل الروماتويدي مما يسمى بمرض بهجت Behcets disease (Asatsuma-Okumura *et al.*, 2020). ووجد أيضاً أنه يسهم في ازدياد الاستجابة المناعية للجسم ضد مرض السل الفطري (Solgi *et al.*, 2006).

واستخدم علاج الامفوترسين اللايوسومي ب الذي يعد مضاداً لداء اللشمانيا ومقرراً عالمياً فهو مركب دهني معقد او بشكل غروي شحمي يتركب من خليط من الفوسفويت داي كولين والكوليسترول وداي سيترول فوسفاتيز كليسيروول. يعد الامفوترسين اللايوسومي ب من مركبات البولين وهو مضاد فطري واسع الطيف وكذلك مضاد للخمائر Yeasts والاعفان Moulds التي تشمل المبيضات Candida بأنواعها وفطر الرشاشيات *Aspergillus spp.* والاعفان الخيطية فضلا عن الطفيليات والاولي مثل اللشمانيا، ويعد علاجاً جيداً جيد لهذه الأنواع ويستعمل بشكل واسع حول العالم (Moen *et al.*, 2012). تم استعمال العقار في العام 1950 بوصفه مضاداً للفطريات وبجرع محدودة لسميته العالية التي تسبب تسمم الكلى وبقاء تأثيره السام في الجسم وبعد اضافة اللايوسوم او الدهن عليه تطور وأصبح أقل سمية مع تحسن الاستجابة الحيوية للخلية له (Menezes *et al.*, 2015).

هدفت دراستنا الى:

- 1- اختبار فعالية عقاري الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب كل على حده ومجتمعين سويا على نمو وعدد وزمن الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية.
- 2- درس تأثير كل عقار لوحده ومجتمعين سويا على المظهر الخارجي لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية.
- 3- درس سمية العقارين مما قد يسهم في تقليل الجرعة المعطاة من الامفوترسين اللايبوسومي ب والثاليدومايد.
- 4- حددت ميكانيكية عمل هذه الادوية على المستوى الجزيئي للطفيليات بدراسة تأثيرها في بعض المورثات وملاحظة التغيرات التي تحدث فيها مثل مورث *KMP-II* ومورث *NDI* والسلسلة الداخلية المستنسخة *ITS1*.
- 5- دراسة النمط التطوري الظاهري الشجري لمعرفة مدى التوافقات والتقارب والتباعد بين العينات المعاملة وغير المعاملة بالادوية لكلا النوعين من اللشمانيا.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

الفصل الثاني

استعراض المراجع Literature Review

1.2 جنس اللشمانيا Leishmania Genus

يعد داء اللشمانيا من الامراض التي تسببها أنواع من الابدائيات Protozoa داخل خلوية والتي تعود الى رتبة Kinetoplastida وعائلة Trypanosomatidae من جنس الـ Leishmania والتي تكون عادة متشابهة في الشكل ولا يمكن التمييز بين أنواعها (Al-meida et al., 2021)

ووجد طفيلي اللشمانيا بانواع متعددة للعالمين القديم وتشمل *L. major* ، *L. aethiopica* ، *L. donovani* ، *L. infantum* ، *L. tropic* ، *L. chagasi* ، اما لشمانيا العالم الحديث فتشمل *L. braziliensis* ، *L. venezuelensis* ، *L. amazonensis* ، *L. enriettii*

توجد اربع أنواع من اللشمانيا مثل داء اللشمانيا الجلدي Cutaneous Leishmaniasis، داء اللشمانيا المخاطي الجلدي Mucocutaneous Leishmaniasis، الذي يعرف ايضاً بـ اسبونديا *Espundia*، داء اللشمانيا الاحشائي Visceral Leishmaniasis الذي يعرف بالكلازار Kala-azar وداء اللشمانيا المنتشر Diffuse leishmaniasis وبحسب مكان الإصابة بالاعتماد على مناعة ومقاومة العائل (Galluzzi et al., 2018).

عرف المرض بداء اللشمانيا الحشوي وباسم كلازار او الحمى السوداء، وفي عام 1756 ولحظ بعد فحص مريض تركي أنه تم ترك ندبة قبيحة طوال الحياة. وقد شخص ويليام ليشمان هو طبيب في الجيش البريطاني في الهند عام 1951 بقع دم دم وهي اجسام بيضوية الشكل في طحال جندي بريطاني كان يعاني من نوبات حمى وفقر دم وضمور عضلي وتورم بالطحال فسميت بحمى دم دم ونشر النتائج 1903 ليسجل الاكتشاف باسمه وليم ليشمان Leishman وربط الكلازار باسم صديقة جارس دونوفان (Guran, 2018).

اهم عوامل الضراوة في اللشمانيا :

1- انزيمات الفوسفاتيز الحامضية (APE) Acid phosphatse Enzymes

انزيمات محللة في اللشمانيا توقف انتاج H_2O_2 و O_2 للخلايا البلعمية وتعمل على حماية الطفيلي من الظروف البيئية غير الملائمة.

2- انزيم بروتيناز Protease

يوجد في الطور غير المسوط وظيفته حماية الطفيلي في الخلية البلعمية من البلعمة.

3- المركب لايبو فوسفو كليكان Lipophosphoglycan coat (Lpg)

يغطي هذا المركب السطح الخارجي لخلية الطفيلي وبالتالي يعزز بقاءه في المضيف حياً (Robert et al., 2011).

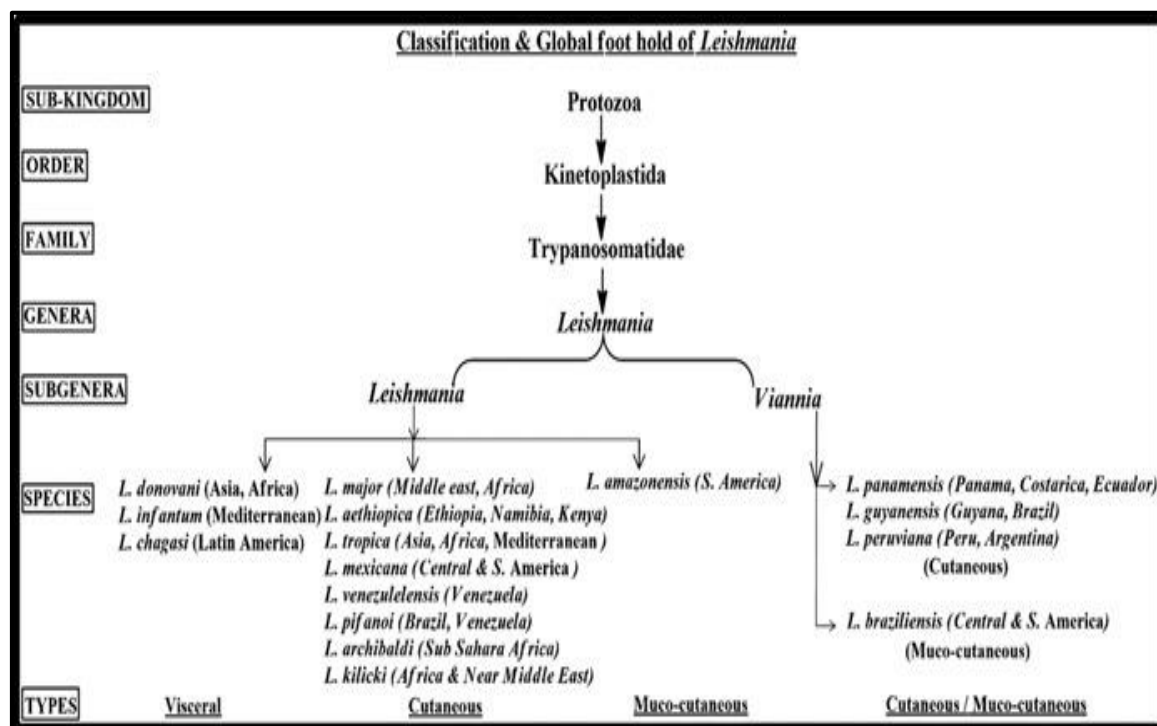
العامل الناقل لهذا الطفيلي هو انثى ذبابة الرمل Sand Fly من نوع Phlebotomus في العالم القديم و Lutzomyia في العالم الحديث (Garrido-Jareno et al., 2020). يوجد ما يقرب من 30 نوع من هذه الذبابة والتي يعادل حجمها ثلث حجم البعوضة العادية وتنشط في المساء وتسبب العدوى وذلك بنقل الطور المسوط الى دم الانسان باللسع لاماكن المكشوفة من الجسم كالوجه والساقين واليدين (Bates et al., 2015)

بحسب تصريح منظمة الصحة العالمية WHO يُعد المرض من بين التسعة امراض المهملة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية التي تنتشر في قارات اسيا وافريقيا وامريكا واوروبا (Torres-Guerreno et al., 2017).

اشارت أكثر الدراسات الى دور السفر والتهجير من المناطق المتوطن فيها المرض الى مناطق أخرى جديدة بوصفه سبباً مهماً لتفشي المرض ولانتاج سلالات جديدة هجينة أكثر مقاومة للعلاج من سابقتها مع وجود العامل الناقل (Sabzevari et al., 2020).

2.2 تصنيف اللشمانيا Classification of Leishmania

يمكن تصنيف اللشمانيا بحسب (Gedda et al., 2019) كما يتضح بالشكل الاتي:



الشكل (1): تصنيف أنواع اللشمانيا (Gedda et al., 2019)

3.2 شكل ودورة حياة طفيلي اللشمانيا

Morphology and Life Cycle of *Leishmania*

يوجد طفيلي اللشمانيا بشكلين او طورين هما الطور المسوط Promastigote وعادة ما يقطن في المضيف اللاقري وهو انثى ذبابة الرمل (العامل الناقل) والطور غير المسوط Amastigote في المضيف الفقري اللبائن سواء كان انسان او كلب او قوارض (Sunter and Gull, 2018).

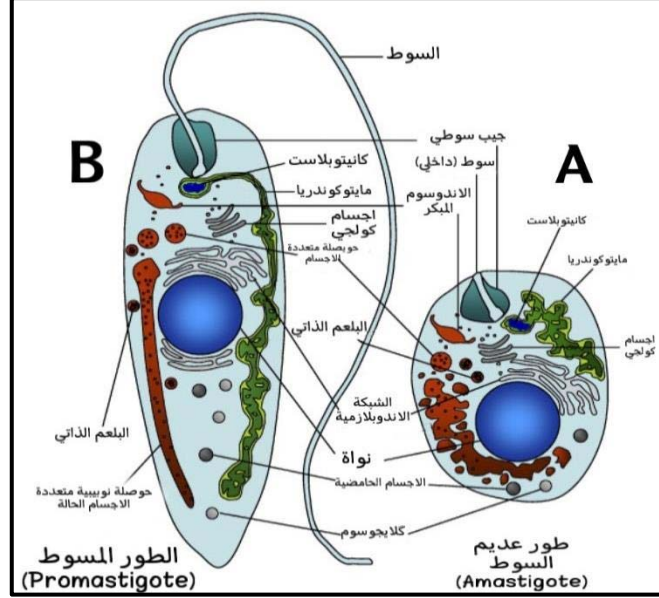
1.3.2 الطور غير المسوط Amastigote Stage

يتميز هذا الطور بشكله البيضوي غير المسوط الذي يبلغ طوله 3-5 مايكروميتر ويتوسطه نواة بيضوية الشكل او مستديرة يجاورها جسم مركب صغير السوط يكون غير فعال فهو محفظة او جيب سوطي يقع بين الساييتوبلازم الداخلي والخارجي ويحتوي الساييتوبلازم على الفجوات والميتوكوندريا وخلايا قاعدية وحبيبات الفوليوتين الحاوية على الـ RNA ويوجد هذا الطور عادة داخل الخلايا البلعمية الملتزمة للانسان او الحيوان وتتضاعف بالانقسام العرضي Binary Fission (Khan et al., 2015).

2.3.2 الطور المسوط Promastigote Stage

يتميز هذا الطور بشكله المغزلي الذي يبلغ طوله 15-20 مايكروميتر وعرضه 1.5-3.5 مايكروميتر يتحول الى الطور المسوط في المعى الخلفي لانثى ذبابة الرمل ويتكون من نواة وسطية

وينتقل الجسم الحركي الى النهاية الامامية الحاوية على السوط الدقيق الذي يبلغ طوله 15 - 28 مايكروميتر ويوجد الطور المسوط في المعى الامامي للقناة الهضمية للحشرة الناقلة ويتضاعف بالانشطار الطولي (Longitudinal Fission) (Khan *et al.*, 2015).

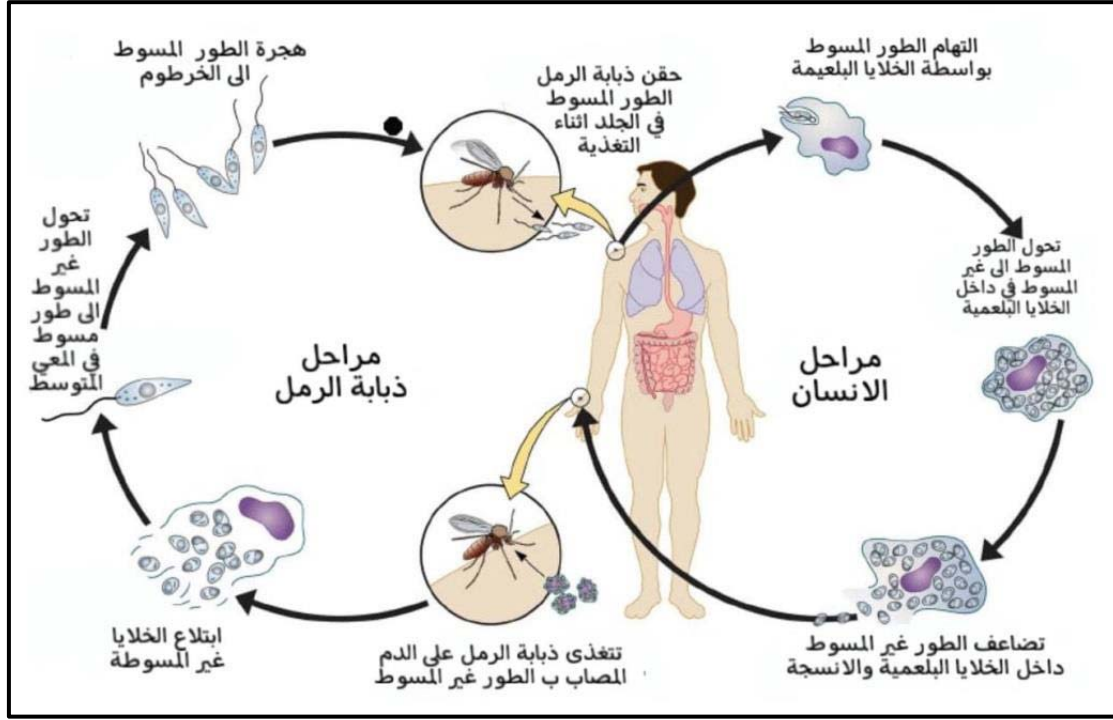


الشكل (2): أطوار طفيلي اللشمانيا (Khan *et al.*, 2015)

3.3.2 دورة حياة طفيلي اللشمانيا Life Cycle of Leishmania

يعد طفيلي اللشمانيا من الطفيليات ثنائية المضيف ويمر بطورين للنمو في دورة حياته الطور الأول هو: الطور السوطي Promastigote خارج الخلية الحية Extracellular وتكون في امعاء الحشرة الناقلة الـ Sand-Fly، أما الطور الثاني فهو طور عديم السوط Amastigote وهي داخل الخلية الحية Intracellular للمضيف الفقري (Sadlova *et al.*, 2021). إذ تبدأ انثى ذبابة الرمل الحاملة للإصابة بالطفيلي بحقن المضيف الفقري بالطور المسوط عند تغذيتها على وجبة الدم عن طريق وخز او جرح تحدثه في جلد المضيف الفقري ليتم بلعمة هذا الطور بواسطة الخلايا الملتزمة Phagocytosis وتبقى خلايا الطفيلي حية داخل خلايا الدفاع الأول وبعد حدوث تغيرات شكلية يتحول الطفيلي الى الطور غير المسوط ويقوم بمضاعفة نفسه بالانشطار الثنائي داخل الخلايا البلعية ويستمر بالانشطار الى أن تتحلل الخلايا البلعية ليتحرر الطور غير المسوط ويصيب خلايا أخرى ومن ثم ينتقل بواسطة مجرى الدم الى الجلد او الاحشاء وقد يستقر في الخلايا الملتزمة للأغشية المبطنة لكبد والطحال او نخاع العظم مسببا الإصابة الحشوية. بحسب موقع استقرار الطفيلي تكون الإصابة. ويمكن ان تؤخذ وجبة غذاء من دم الشخص المصاب من ذبابة الرمل وينتقل الطور غير المسوط الى معي الحشرة الخلفي ويتحول في المعى الوسطي الى الطور المسوط ثم تتكاثر

بالانشطار الطولي وتزداد اعدادها وتنتقل الى خرطوم الحشرة Hypostome وتصبح جاهزة للإصابة مرة أخرى (Bates, 2018 ; Teixeira *et al.*, 2013).



الشكل (3): دورة حياة طفيلي اللشمانيا (Esch and Petersen, 2013)

4.2 أنواع داء اللشمانيا والعلامات السريرية المصاحبة لها

Leishmaniasis Types and Related Clinical Signs

يظهر داء اللشمانيا بأشكال مختلفة بحسب مكان الإصابة والاعراض السريرية المصاحبة للمرض اذ عند تشخيص النوع يجب أخذ الدلالة الجغرافية التقليدية للأشكال السريرية ومتابعة توسع او حركة انتقال الافة. نحتاج لتحديد نوع اللشمانيا الى العديد من الدراسات السريرية والوبائية والمجهرية والمصلية للافة وعلى الرغم من ان هذه الطرائق ليست الاكثر حساسية او انها محدودة فقد لجأ العلماء مؤخراً لاستخدام التقنيات الجزيئية المتفوقة من أجل تحديد نوع اللشمانيا المسببة للإصابة. واعتماد النهج العلاجي المبرمج والناجح لمكافحة المرض (Auwera and Dujardin, 2015).

بالاعتماد على العلامات السريرية وموقع الإصابة يظهر داء اللشمانيا بأربعة أنواع أو اشكال

هي:

1.4.2 داء اللشمانيا الجلدي Cutaneous Leishmaniasis

يعد داء اللشمانيا الجلدي الاكثر شيوعاً بين أنواع الاصابات الأخرى ويستوطن حوالي 70 دولة وأن ما بين 600 ألف الى مليون حالة جديدة تحدث سنوياً لهذا النوع من اللشمانيا في جميع انحاء

العالم (Pandey et al., 2021). وقد يكون داء اللشمانيا الجلدي دون أي اعراض او قد يسبب تقرحات جلدية بشكل قرحة حادة او اكثر تختلف في الحجم والمظهر بمرور الوقت تبدأ بشكل عقيدات وتنتهي بشكل تقرحات تشبه البركان لها حافة مرتفعة وحفرة مركزية ويرتبط المرض بسوء التغذية والنزوح وضعف الجهاز المناعي وضعف الحالة الاجتماعية ولاسيما في اقليم شرق البحر المتوسط مثل افغانستان وايران والعراق وسوريا وباكستان (Nassar et al., 2021). ولوحظ أنه اغلب الأنواع الشائعة في العالم الحديث تحصل بواسطة *L. Viannia* و *L. braziliensis* و *L. Panamensis* و *L. guayanensis* وفي العالم القديم تحدث بصورة عامة بواسطة *L. infantum* و *L. tropica* و *L. major* (Ubals et al., 2021).

وغالباً ما يصاحب ظهور البثرة او البثرات اصابات ثانوية بالبكتريا وقد تبقى الاصابة في مكانها او تنتشر في الاوعية اللمفاوية. وعادة يحدث الشفاء الذاتي للجلد بمدة تتراوح بين بضعة اشهر الى سنة او أكثر اعتماداً على نوع اللشمانيا، وقد يترك البعض منها ندباً دائمة على الجلد، وتشير الدراسات الى أن الاشخاص المصابين بنقص المناعة المكتسب أكثر عرضة للاصابة بهذا النوع والأنواع الأخرى (Sousa – Gomes et al., 2017).



الشكل (4): داء اللشمانيا الجلدي، (Abu Rumman, 2018)

2.4.2 داء الشمانيا الجلدي المنتشر Diffuse Cutaneous Leishmaniasis

يعد داء الشمانيا الجلدي المنتشر مرض عالمي نادر الحدوث يرتبط حدوثه بالاستجابة المناعية غير الكافية للخلايا المضيفة تسببها أنواع من الشمانيا في العالم القديم *L. major* و *L. aethiopica* و *L. infantum* و *L. viannia* ومن العالم الحديث *L. amazonensis* و *L. Mexicana*.

يظهر بشكله الأولي بشكل بقع صغيرة تشبه حبة البزاليا تنتشر بشكل عقيدات غير متفرجة في الوجه والظهر والركبتين ويبلغ قطر العقيدة 2-4 سم وقد تظهر في الأنف والأذن بشكل ندبة ضامرة متضخمة حمراء اللون وقد تستغرق فترة العلاج ثلاثين شهراً (Sampaio et al., 2021). لم تلحظ على اليدين والقدمين وفروة الرأس. وان بعض القرحة تكون ذات قشور سميكة تنزف بسهولة عند فصلها وقد يلاحظ إصابة سطحية للغشاء المخاطي للأنف والشفة (Hashignchi et al., 2016).



الشكل (5): داء الشمانيا الجلدي المنتشر، (Calvopina et al., 2006)

34.2 داء الشمانيا المخاطي الجلدي Mucocutaneous Leishmaniasis

انتشر هذا النوع من المرض في القارة الأمريكية، الغابات الاستوائية، غابات الامازون في أمريكا الجنوبية وتسببه نوع الشمانيا *L. brazillensis* او قد يتسبب عن طفيلي *L. panamensis* او *L. guyanensis*.

أطلق عليه اسم *Espundia* اذ تبدأ القرحة في الجلد بعد اللسع بعدة اسابيع وتكون عميقة ثم تمتد لتصل الى المجرى اللمفي مع انتفاخ في العقد اللمفية، ويمتد النخر ليصل الى الانسجة العميقة وقد ينتشر ليصل الى الحاجز الانفي Nasal Septum يصيب البلعوم والحنجرة وقد يحصل نزف في الانف ثم تعمل الالتهابات ثقب في الحاجز الانفي مسببة تشوهات حادة في الوجه وقد تعمل انسداد في البلعوم او الحنجرة ولا يمكن شفائه ذاتياً تصل الى حد اتلاف لعظم سقف الحلق (Sachdeva and Sharma, 2016).



الشكل (6): داء الشمانيا المخاطي الجلدي ، (Abdou, 2020)

4.4.2 داء اللشمانيا الاحشائي Visceral Leishmaniasis

داء اللشمانيا الحشوي او ما يعرف بالحمى السوداء Kala-azar تسببها كل من

L. donovani و *L. Infantum* و *L. chagasi* و *L. archibaladi* يستوطن هذا المرض في المناطق الريفية في الهند والنيبال والسودان وبنغلادش والبرازيل. يصيب هذا الطفيلي الخلايا البلعمية الملتهمة وينتقل بعد التهامه الى الكبد، الطحال، نخاع العظم ويلحظ ظهور اعراض حبيبية على الجلد قبل ظهور الاعراض الجهازية (Nampoothiri et al., 2016). سنوياً يتم تسجيل 61% من اجمالي الحالات في الهند وبعض المقاطعات تصل الى أكثر من 600 حالة (Kumar et al., 2020).

عد داء اللشمانيا الحشوي من الامراض الفتاكة القاتلة اذا تركت من دون علاج واهملت، بحسب تقرير منظمة الصحة العالمية WHO انه من بين 1.6 مليون حالة جديدة مسجلة سنوياً 1.1 حالة

شخصت كلشمانيا جلدية و 0.5 حالة لشمانيا حشوية وان 90% من الحالات الحشوية الجديدة تتركز في بنغلادش والبرازيل والهند والسودان (Srinivasan et al., 2018).

من اعراض داء اللشمانيا الحشوي الحمى الطويلة وفقدان الشهية وتضخم الكبد والطحال، ويعد سوء التغذية ونقص المناعة من العوامل الخطيرة للإصابة بمرض الحمى السوداء وفقر الدم وقد صاحبها نقص في الصفائح الدموية ينجم عنه حدوث نزف في البثرات الموجودة في الانسجة المخاطية فضلا عن نقص في خلايا الدم البيض، سعال، اسهال مزمن، استمرار الجلد، التهاب الغدد اللمفية، او التهاب الكلية المزمن. ويمكن أن تكون الإصابة معتدلة ينجم عنها شفاء ذاتي او قد تتكرر الإصابة في حالات نقص المناعة (Adamczick et al., 2018; Khan et al., 2015).

وقد تظهر حالات جلدية تعرف بـ Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) ويمكن أن تظهر هذه الحالة بعد اشهر او سنوات من العلاج الناجح لداء اللشمانيا الحشوي وهذا لا يهدد الحياة ولكنه يشكل أثراً او عيباً في الجلد اذ يظهر كمضاعفات لداء اللشمانيا الاحشائي وتسببه *L. donovani* يظهر بشكل حطاطات او عقيدات على الجلد، وتحدث الإصابات في افريقيا واسيا ومن اللافت للنظر ان 90% من الإصابات في افريقيا تكون بشكل طفح جلدي حطاطي Papularrash وان الفاصل الزمني بين الإصابة باللشمانيا الاحشائية و PKDL هو من (0-13) شهرا بينما 90% من الإصابات الاسيوية تكون بشكل طفح بقعي Macular والفاصل بينه وبين الإصابة الاحشائية 2-3 سنوات. يعد اكثر شيوعا في افريقيا اما في السودان فيتعافى حوالي 85% ذاتيا في 12 شهراً ويتم علاج الحالات الشديدة او المزمنة فقط بينما في اسيا يتم علاج المرضى جميعاً وبعد العلاج يختفي المرض ويطور مناعة دائمة مماثلة للإصابة الاحشائية وتشير بعض التقارير لوجود شفاء ذاتي للمرض Self – Healing (Zijlstra, 2016).



الشكل (7): داء الشمانيا الاحشائي، (Abdou, 2020)

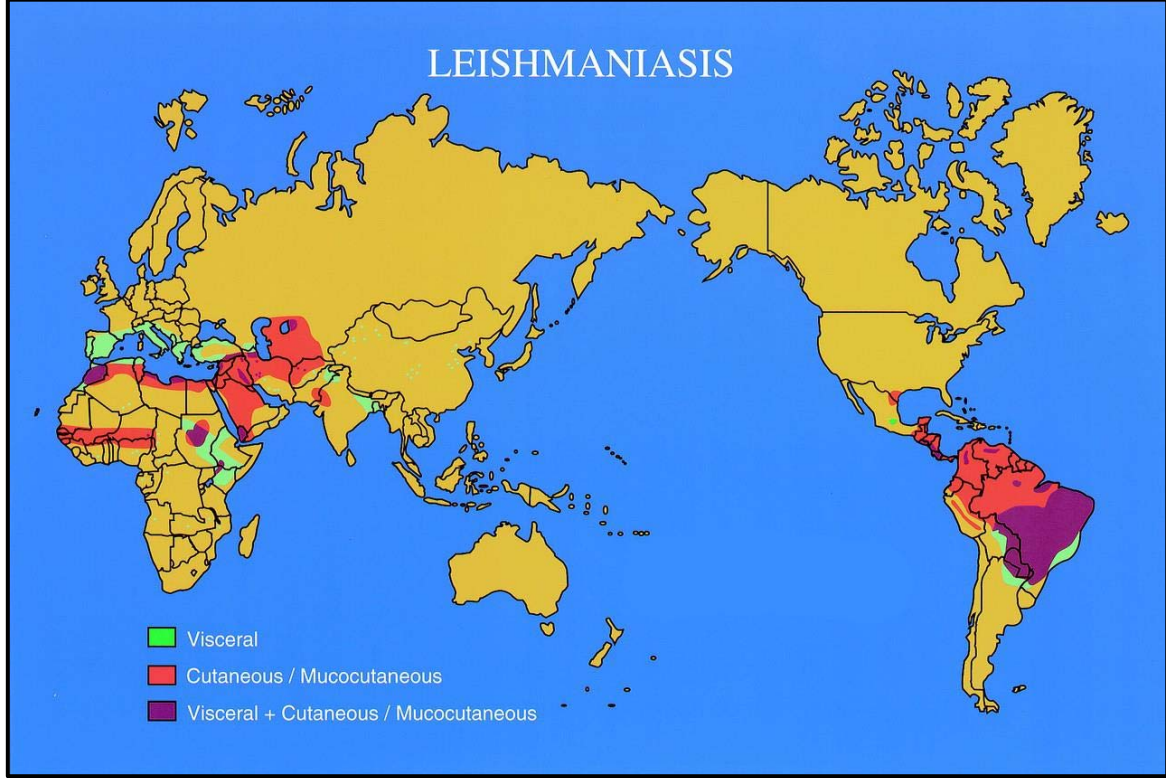
5.2 اللشمانيا والتوزيع الجغرافي لها

History and Geographic Distribution of Leishmaniasis

اشارت الوثائق القديمة الى أن داء اللشمانيا كان منتشرًا في العصور القديمة، وقد حدد طفيلي اللشمانيا بوصفه عاملاً مسبباً للمرض وذبابة الرمل كناقل ساري لداء اللشمانيا وقد استمر اكتشاف أنواع جديدة من اللشمانيا والعامل الناقل حتى القرن الحادي والعشرين (Steverding, 2017). وقد سجلت ما يقارب 0.7 – 1 مليون حالة جديدة لما يقرب من 100 دولة سنوياً يتوطن المرض فيها ويوجد شكلان سريريان شائعان هما داء اللشمانيا الجلدي CL والاكثر شيوعاً وانتشاراً يليه داء اللشمانيا الحشوي VL وانخفضت حالات الإصابة بشكل كبير في العقد الماضي عما سبق لتحسن الوصول الى التشخيص والعلاج ولمكافحة العامل الناقل في اسيا ومع ذلك يعد المرض فتاك في شرق افريقيا للتهجير والفقر وانخفاض المستوى الصحي والمعاشي مؤدياً الى ازدياد انتشاره وبشكل ملحوظ لذا يمثل تطوير العلاج له من الاولويات المطلوبة للحد والسيطرة عليه وايجاد الحلول للتقليل من انتشاره (Burza et al., 2018).

للمرض تاريخ طويل يعود الى القرن الميلادي الأول اذ ظهر كأفة للجلد يسبب تشوهات جلدية واعتبر نموذجاً لداء اللشمانيا الجلدي وظهر في القرنين السادس والثامن عشر آفات جلدية بين العمال والمزارعين العائدين من جبال الانديز تشبه الجذام وكانت تعرف بالجذام الابيض او مرض الانديز او مرض الوادي في افريقيا والهند. يعد داء اللشمانيا من الامراض المستوطنة التي تصيب أكثر من 98 دولة مع انتشار عالمي يبلغ 12 مليون شخص ، تعتبر شرق افريقيا والبرازيل وشبه القارة الهندية مناطق ساخنة لحالات مرتفعة في الشرق الاوسط لكل من اللشمانيا الجلدية ، في حين أن اللشمانيا الاحشائية تنتشر في حوض البحر الابيض المتوسط واسيا الوسطى وامريكا اللاتينية. ولا يتوطن المرض بشكل رئيسي في قارة اوربا لكن سبب العدوى هو انتقال السياح والمسافرون للعمل او اداء الخدمة العسكرية (Guran, 2018). تتوزع اللشمانيا الجلدية على حوالي 59 بلد هي افغانستان، الجزائر، بوليفيا، البرازيل، كولومبيا، ايران، العراق، باكستان، سوريا، وتونس ما يقرب 85% من هذه الحالات هي للشماني الجلدية بحسب تقرير منظمة الصحة العالمية (Jones and WHO, 2020) (Welburn, 2021; وتسببها من *L. major* و *L. tropica*. أما داء اللشمانيا الجلدي المخاطي المعتمد على الاستجابة المناعية للمضيف فيتميز بقوة اصابته وسرعة شفائه. لوحظ أن 90% منه منتشر في بوليفيا وظهر ايضا في اثيوبيا تسببه *L. aethiopica* (Jones and Welburn, 2021; Griensven et al., 2016) وفيما يتعلق بداء اللشمانيا الحشوي الجهازى Systemic المتسبب عن *L. infartum*، *L. chagasi*، *L. donovani*

هناك 59 دولة موبوءة به ان 90% من الحالات تقع في البرازيل ،اثيوبيا ،الهند ،كينيا ،الصومال ،جنوب السودان والسودان (Barley et al., 2019).



الشكل (8): انتشار داء اللشمانيا في العالم (Ramos-Martinez et al., 2015)

6.2 داء اللشمانيا في العراق Iraqi Leishmaniasis

ينتشر داء اللشمانيا الجلدي CL في العراق وتسببه *L. major* التي توجد بشكل أكبر من *L. tropica*.

توجد اصابات ثانوية تسببها الالتهابات البكتيرية المرافقة لداء اللشمانيا الجلدي مما يزيد من المشاكل الصحية وتعقيد الحالة. وقد كان العراق للفترة من 1989 - 2011 أقل من حيث حالات الاصابة من سوريا والمملكة العربية السعودية ولكنه أكثر من الاردن وقد لحظ انتشار هذا المرض في وسط وجنوب العراق (AL-Obaidi, 2016).

وعد العراق من البلدان الموطنة للمرض بشكله الجلدي والاحشائي وتعرف اللشمانيا الجلدية بحبة بغداد او (الاخت) او حبة حلب او البثرة الشرقية (في العالم القديم) ومرض الانديز او اسبونيا في العالم الجديد (Nazzaro, 2014).

لقد اكد (Ali et al., 2018) ان داء اللشمانيا متوطن في العراق بشكله الجلدي والاحشائي سجل ما يقارب 1800 حالة للشمانيا الاحشائية من مجموع 4000 - 5000 اصابة سنوياً. وسجلت أيضاً اصابات للجيش الامريكي في العراق ما يقرب من 700 حالة من اللشمانيا الجلدية في 8 محافظات عراقية (AL-Khayat et al., 2018) كما اشار (AL-Waaly and Shubber, 2020) انه جمع 4276 نموذجاً عام 2018 من مستشفى الديوانية التعليمي شخص 1489 منها كاصابة جلدية لطيفلي اللشمانيا.

أما بالنسبة للشمانيا الاحشائية Kala-azar فأولى الحالات سجلت تحديداً في مدينة الموصل (Taj-Eldin and Alousi, 1954) ومسببها كل من *L. donovani*, *L. infantum* ، كما سجلت وزارة الصحة العراقية بالتعاون مع منظمة الصحة العامة اعداد كبيرة جداً من الاصابات ولحظ ان اصابات الذكور أكثر من الاناث ذلك لكثرة خروجهم من المنزل وتعرضهم للسع (Nail and Imam, 2013). وان الاطفال بعمر 4 - 8 أكثر عرضة للاصابة بسبب نقص المناعة (Osman, 2011). ووجد بعض الباحثون ان لعامل الجو ودرجات الحرارة تأثير كبير في انتقال وانتشار المرض اذ ينشط المرض في الجو المعتدل لاسيما في ايلول وتشرين الأول والثاني لملاءمة الجو للعامل الناقل (ذبابة الرمل) وتوفر درجة حرارة ملائمة لحضانة الطفيلي (Stoops et al., 2013) كما تنطبق نفس الظروف على اللشمانيا الجلدية (AL-Warid et al., 2019). قد تستغرق فترة الشفاء الذاتي من 6-12 شهرا تاركة ندبة مشوهة اما اذا تم علاجها تستغرق فترة اقل من دون ترك ندب او اثار وان 10% من الاشخاص المصابين قد يعاودون الاصابة مرة أخرى ذلك لعدم الشفاء التام او كونهم ذو مناعة غير كافية ضد الطفيلي اويعانون من سوء التغذية Malnutriton التي تؤدي الى نقص البروتينات، فيتامين A، الحديد والزنك مما يساعد على الاصابة . ولا يوجد لقاح الى حد الآن لذا يجب الوقاية من المرض. من اسباب خطورة المرض وانتشاره بشكل كبير هو ان فترة حضانة الطفيلي تمتد من شهرين الى ثمانية اشهر قبل ظهور حبة صغيرة في مكان اللدغة مما يزيد من خطورة المرض (Al-Kalid, 2018) .

7.2 تشخيص اللشمانيا Diagnosis of Leishmaniasis

1.7.2 التشخيص المجهرى Microscopic Diagnosis

الفحص المجهرى لعينة تؤخذ مباشرة من موقع الإصابة اذا كانت جلدية اما الإصابة الاحشائية بأخذ خزعة لها ويتم عمل شريحة من النسيج المصاب ويصبغ بصبغة كيمزا او صبغة الايوسين لنشاهد الطور غير المسوط في حالة الإصابة تحت عدسة المجهر.

2.7.2 عزل الطفيلي خارج وداخل الجسم الحي *In Vitro and in Vivo Isolation*

يمكن تنمية الطفيلي ثنائي الطور في الوسط الصلب المضاف له اكار الدم والوسط السائل او حقن الطفيلي في داخل جسم الفأر او الهامستر الحي وعزل الطفيلي منه.

3.7.2 الاستجابة المناعية *Immune Response*

فحص الحساسية لمستضدات الطفيلي العالية بكشف مدى الاستجابة المناعية العالية للجسم وخصوصا في اللشمانيا الجلدية.

4.7.2 الكشف عن الاجسام المضادة *Antibody Detection*

غالبا ماتستخدم تقنية الاليزا للكشف عن المستضدات لتشخيص اللشمانيا الاحشائية والجلدية.

5.7.2 التشخيص الجزيئي *Molecular Diagnosis*

وذلك بتضخيم الـ DNA وباستخدم تقنية الـ PCR وللكشف عن نوع اللشمانيا وبدقة استعمل فحص PCR-RFLP لتشخيص السلاسل الجينية (Reimao et al., 2020)

6.7.2 تقنيات كيموحيوية بتحليل النظير الانزيمي *Biochemical Techniques by Enzymatic Isotope Analysis*

تم التأكيد على ضرورة دراسة حركية 15 انزيم على الأقل معروفة عند طفيلي اللشمانيا منها انزيم الماليك ME والمانوز فوسفات ايزوميراز S.MPI (AL-Nahhas, S. ., 2006)

8.2 المعالجة لداء اللشمانيا *Treatment of Leishmaniasis*

يعد داء اللشمانيا من الامراض المعدية الخطيرة في عصرنا الحالي اذ يصيب ملايين الاشخاص في انحاء العالم جميعها. ويعتمد علاج المرض على

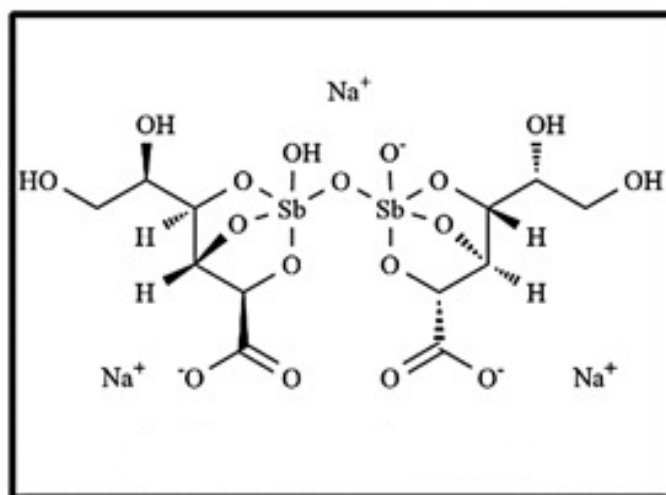
1- العوامل العلاجية الكيميائية، اذ وجد ان هناك 25 مركباً او صيغة كيميائية اظهرت فعالية ضد اللشمانيا ولكن أثبت عدد قليل من هذه المركبات فعاليتها العلاجية بصورة مثالية وذلك بسبب سميتها العالية للمضيف، اسعارها المرتفعة ومقاومة الطفيليات لها فضلاً عن طول فترة العلاج مما يؤدي الى ترك العلاج وحصول انتكاسات حادة مما ينتج عنها عدم الافادة من العلاج . (Uliana et al., 2017 ; Mishra et al., 2012)

2- طريقة الكي باستخدام ثاني أوكسيد الكربون او مايسمى بالتلج الفحامي السائل لعلاج القرحات الصغيرة التي تتجمد وتجف تحت تأثير تخدير موضعي او بالحرارة بدرجة 40-42 درجة مئوية.

3- الاستئصال بالجراحة خصوصا في حالات اللشمانيا المخاطية الجلدية والاحشائية والجراحة التصنيفية التجميلية اذا كانت هناك ندب مشوهة يمكن ازالتها بالجراحة (Aronson *et al.*, 2017) اما المعالجة الكيميائية فتشمل:

1.8.2 الانتيمون الخماسي التكافؤ Pentavalent antimony

توصي منظمة الصحة العالمية باستخدام مضاد الانتيمون الخماسي التكافؤ بصورة رئيسة في علاج الآفة الجلدية والآفة الجهازية وقد اعتبر هذا العقار الخط الأول لعلاج داء اللشمانيا واستخدم في البلدان النامية لسنوات عديدة (Moura *et al.*, 2016) ولهذا المركب صيغتان هما Glucantime, و Pentosam, $C_{12}H_{38}O_{26}$, (Sb) Sodium Sibu Gluconate (SSG) Mohapatra, 2014 ; Ribeiro *et al.*, $C_{14}H_{29}O_{10}N_2$ (Sb) Meglumine animoniate (2014).



الشكل (9): الصيغة الكيميائية للمركبات الانتيمونالية (Menezes *et al.*, 2015)

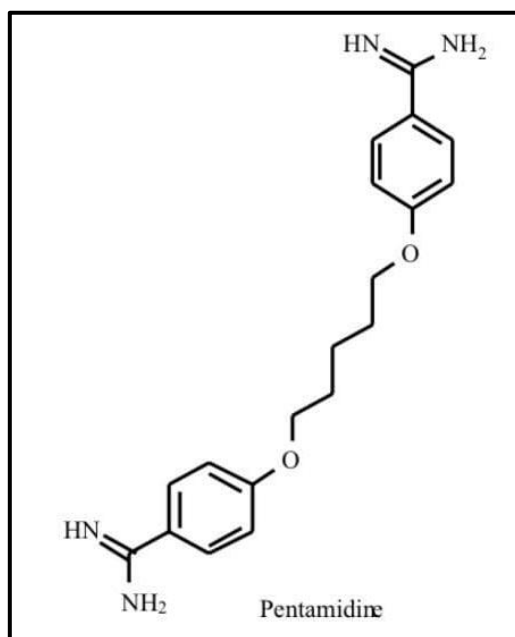
بقيت الآلية الدقيقة لعمل الانتيمون لغزا محيرا للعلماء اذ يعتقد بانها تعمل على اختزال Sb (V) الخماسي الى Sb(III) الشكل الثلاثي الاكثر سمية للطور عديم السوط Amastigote في داخل الخلية الملتزمة Macrophage للجسم الحي (Mohapatra, 2014; Halder *et al.*, 2011) لذا يعمل على التأثير في الطاقة الحيوية لطفيلي اللشمانيا بتنشيط تحليل الكلوكونز Glycolytic واكسدة احماض بيتا الدهنية في تثبيط فسفرة الـ ADP واختزال انتاج ATP و GTP في الطور عديم السوط (Silva-Jardim *et al.*, 2014; Halder *et al.*, 2011) وظهر في الآونة الأخيرة ان الانتيمون يمكن أن يغير اكسدة الثايول المحتملة في داخل الخلية الحية ويثبط اختزال الثريانونيون ويجعل الطفيلي اكثر عرضة للاجهاد التأكسدي مما يتسبب بموت الطفيلي

(Eddaikra *et al.*, 2017). وقد ثبت فعلياً آلية عمل الانتيمون وهي تثبيط عمل الفوسفو فركتوكاينز وبذلك يمنع تحويل فركتوز 6 فوسفيت الى فركتوز 6،1 ثنائي الفوسفيت وان يقلل انخفاض تركيز هذا المركب من فعالية الطفيلي ومن ثم يؤدي الى استنزاف الطاقة اللاهوائية للطفيلي وموت الطفيلي (Stephen, 2008). يعمل استخدام الانتيمون على تثبيط انزيم DNA topoisomerase ومن ثم يؤدي الى تثبيط عملية الانقسام لخلايا الطفيلي وفشل تكوين خلايا جديدة (Silva-Jardim *et al.*, 2014; Haldar *et al.*, 2011). ويعطى هذا العلاج للمصابين بداء الشمانيا الحشوي والجلدي والمخاطي بالحقن العضلي IM او الحقن الوريدي IV ويكون العضلي مؤلم جداً وبجرعة 20 - 28 ملغم/ كغم من وزن الجسم يومياً او كل يومين لمدة 28-30 يوماً (Aronson *et al.*, 2017; Jain and Jain, 2013).

2.8.2 البنتاميدين Pentamidine

يوجد بشكل Pentamidine isethionate ويعد عامل مضاد للالوالي يساهم في علاج حالات الالتهابات الرئوية والاصابة بالمتكيسة الرئوية او ما تسمى *Pneumocystis jirovecii* وداء الشمانيا والمتقبيات وهو من الفئة المضادة للعدوى الفطرية، الديدان الطفيلية، الأوليات، امراض التهابات الرئوية للمرضى المعرضين لخطر الاصابة بنقص المناعة المكتسبة، مرض النوم الافريقي (Hafiz and Kyriakopoulos, 2021) وصيغته الجزيئية $C_{19}H_{24}N_4O_2$ وهو من نوع Dibenzamidine ويتداخل مع بناء الحامض النووي الـ DNA للطفيلي ويؤثر على غشاء الماييتوكوندريا ليسبب موت الخلية (Jain and Jain, 2013).

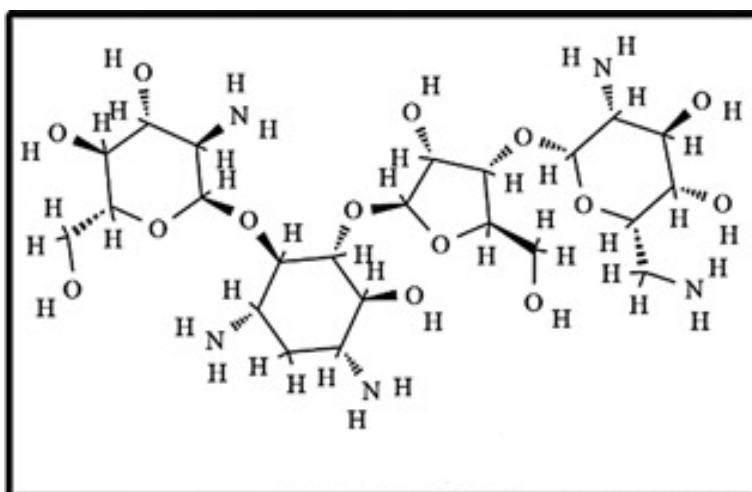
أستخدم البنتاميدين علاجاً لداء الشمانيا ولكن له اثار جانبية مهمة مثل السمية التي ينتج عنها داء السكر Diabetes mellitus، نقص السكر في الدم Hypoglycemia نتيجة تضرر البنكرياس، انخفاض ضغط الدم Hypotension، تسارع نبضات القلب Tachycardia، التهاب عضلة القلب والم في العضلات Myalgia، السمية الكلوية Renal toxicity ويمكن أن يؤدي الى الوفاة ولا يستخدم هذا الدواء بشكل متكرر لظهور حالات المقاومة والسمية العالية وفعاليتها المنخفضة وتكوين خراجات مكان الحقن (Ulina *et al.*, 2017; Menezes *et al.*, 2015).



الشكل (10): الصيغة الكيميائية لعقار البنتامدين (Menezes *et al.*, 2015)

3.8.2 بارومومايسين Paromomycin

يعد من المضادات الحيوية وقد وجد أنه يعمل مضاداً فعالاً ضد اللشمانيا الجلدية (Matos *et al.*, 2020) يوجد هذا المركب بشكل Paromoycin sulfate وصيغته الكيميائية هي $C_{23}H_{47}O_{18}S$ وينتمي الى مجموعة الامينوكلايكوسايد Aminoglycoside ومستخرج من بكتريا *Streptomyces rimosus*.



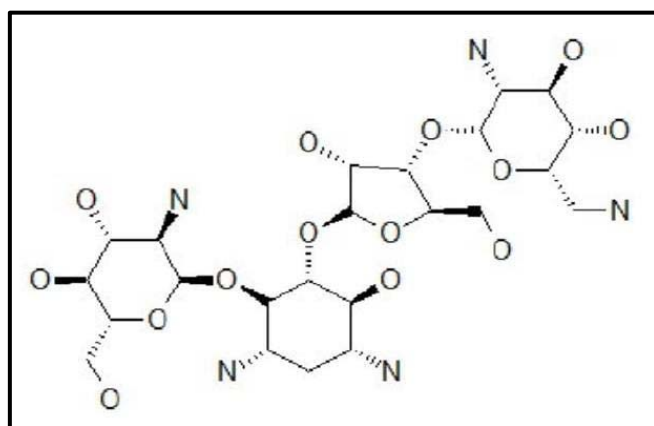
الشكل (11): الصيغة الكيميائية لعقار البارومومايسين (Menezes *et al.*, 2015)

يستخدم علاجاً ضد *Amoebiasis*، *Leishmaniasis*، *Giardiasis* ويستخدم علاجاً (مرهم موضعي) لعلاج اللشمانيا الجلدية ويعطى ايضاً كحقنة وريدية او عضلية بجرعة

15 ملغم/ كغم من وزن الجسم لمدة 21 يوماً أو 20 ملغم/ كغم من وزن الجسم لمدة 17 يوم (Menezes *et al.*, 2015; Mohapatra, 2014) ويعمل هذا الدواء على منع تخليق البروتينات فقد يعمل على تغير سيولة الغشاء الخلوي ونفاذيته ويتفاعل مع الرايبوسومات ويتداخل مع امكانيات عمل غشاء الماييتوكونديا ويمنع التنفس (Chawla *et al.*, 2011).

4.8.2 ملتيفوسين Miltefosine

يعد أول علاج للشمانيا الاحشائية يعطى بالفم ويكون فعالاً تجاه بعض أنواع اللشمانيا الجلدية ويحذر من اعطائه للحوامل لأنه يسبب تشوهات خلقية للجنين Teratogenicity (Croft and Oliaro, 2011). استخدم مؤخراً لعلاج VL وال PKDL في حالة فشل العلاج بالمركبات الانتيمونالية واستخدم لعلاج MCL والجرعة المستخدمة هي 2.5 ملغم/ كغم من وزن الجسم لمدة 28 يوماً (Monge-Maillo, 2015; Jain and Jain, 2013).

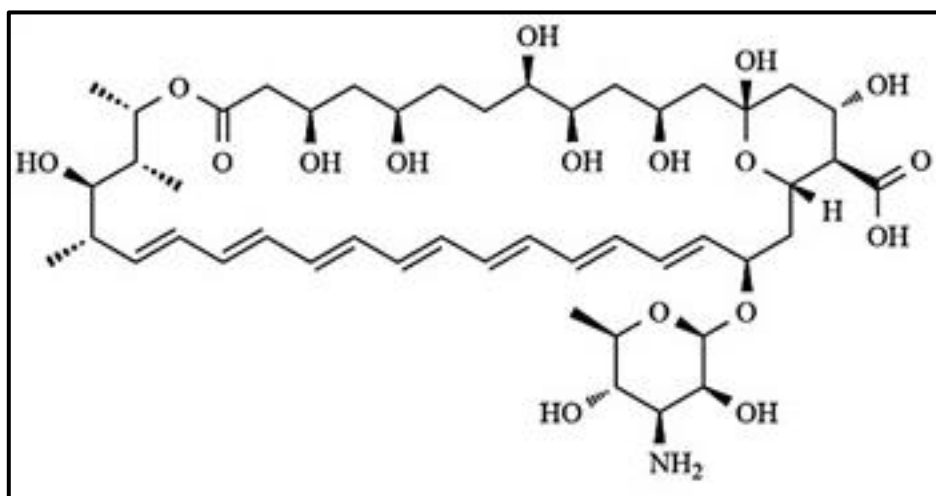


الشكل (12): الصيغة الكيميائية لعقار الملتيفوسين (Menezes *et al.*, 2015)

آلية عمل الملتيفوسين غير معروفة ولكن يعتقد أنه يتداخل مع لبيدات الغشاء الخلوي للطفيلي ويندمج معه ويتداخل مع اللبيدات المفسفرة والستيرولات ويثبط عمل Cytochrome coxidase الذي يتعلق بعمل الماييتوكونديا ووظائفها والموت المبرمج Apoptosis (Ware *et al.*, 2011; Mohapatra, 2014) ولحظ أنه يزيد من تنشيط قناة Ca^{+2} في الغشاء البلازمي للطفيلي وله تأثير مثبط للساييتوكوم والاكسديز في غشاء الماييتوكونديا وإزالة الاستقطاب Depolarization من غشاء الماييتوكونديا ومن ثم نزع الطاقة (Pinto-Martinez *et al.*, 2018).

5.8.2 الامفوترسين ب Amphotericin B

يعد من مركبات البوليين الواسعة الطيف وهو مضاد فطري فعال Antifungal وصيغته الكيميائية $C_{47}H_{73}N_{17}O_{17}$ يستخدم كخطاً ثانياً لعلاج اللشمانيا الجلدية *L. tropica* والمثقبية الكروزية *T. Cruzi* (Khan *et al.*, 2016) ويتواجد الدواء بأربعة اشكال هي: Lipid (Abeclat) و Colloid dispersion (Amphocil) و Deoxycholate Liposomal complex و amphotericin (AmBisme) ويميل الامفوترسين باتجاه الستيرويدات Sterols مثل الايركوستيرون Ergosterol والكوليسترول (Mohpatra, 2014 ; Jain and Jain, 2013)



الشكل (13): الصيغة الكيميائية لعقار الامفوترسين ب

ويعمل هذا الدواء على الارتباط بستيرويدات Sterols غشاء خلية الطفيلي الذي يحوي على الـ ergosterol فيعمل على زيادة نفاذية غشاء الخلية ويفقد الطفيلي الايونات الموجبة مثل K^+ وتؤدي الى توليد الجذور الحرة free radicals لتسبب تحطم الخلية ومن ثم موتها. وعلى الرغم من ذلك عند تكرار الدواء تحصل المقاومة ويرافق العلاج علامات سريرية للمرضى من سمية الكلى وتغيرات قلبية وتحلل دموي وتضرر للكبد فضلا عن الغثيان وارتفاع درجات الحرارة ونقص البوتاسيوم Hypokalemia (Chavez-Fumagalli and Coelho, 2015 ; Menezese *et al.*, 2015)

6.8.2 الامفوترسين اللايبوسومي Liposomal Amphotericin B

وهو امفوترسين شحمي (Am Bisome: LAmB) له تركيبة دهنية فريدة من الامفوترسين ب. وهو من مركبات البوليين الواسعة الطيف لمجموعة من الأمراض الفطرية الانتهازية المهمة طبياً، وله تاثير فعال تجاه الخمائر Yeasts والاعفان Molds فضلا عن الاوالي والطفيليات من مثل اللشمانيا (Stone *et al.*, 2017). اقترته منظمة الصحة العالمية WHO والجمعيات العلمية الرئيسية وتمت

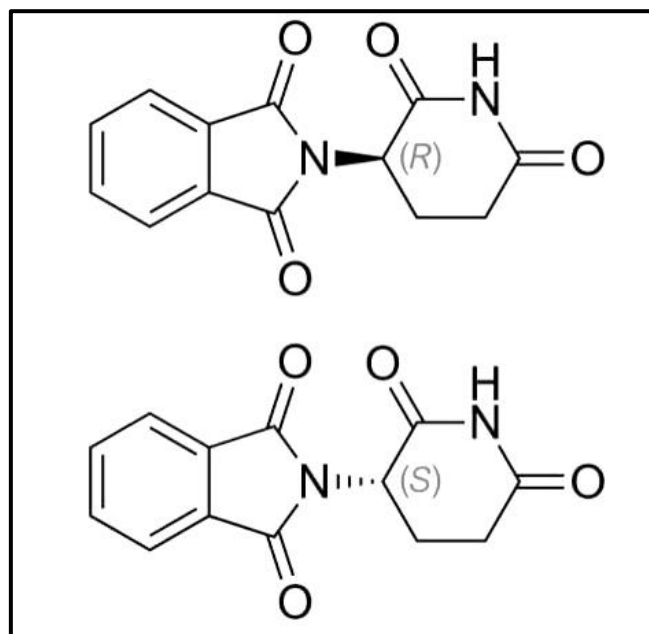
موافقة ادارة الغذاء والدواء Pharma, Deerfield IL, USA وعليه الامفوترسين بشكله الدهني في جميع انحاء العالم يعد من الخط الأول لعلاج أي شكل من اشكال الشمانيا ، ليس الحالات الشديدة التي ترتبط بفيروس نقص المناعة فحسب وإنما للأطفال والبالغين وبجرعة 3-5 ملغم/ كغم من وزن الجسم تعطى لعلاج الشمانيا الاحشائية في الايام 1-5، 14، 21 الجرعة الاجمالية تصل 10 - 30 ملغم/ كغم من وزن الجسم (Shirzadi, 2019). واللايوسوم هو خليط من مواد اليفاتية Amphipathic من مثل اللييدات المفسفرة Phospholipids والكوليسترول (ايركوسيتول) ويعد هذا المركب مضاد فطري عالي الفعالية اذ يرتبط الـ Ergosterol مع غشاء الخلية لتشكل قنوات ايونية منفذة للغشاء داخل الخلية مع تدفق متبادل لايونات Ag^{+2} و K^{+} و Ca^{+2} و Na^{+} مما يؤدي الى تأثير مميت للخلية الحية وكذلك تقارب الجسيمات الشحمية من جدار الخلية الحية ومن ثم اجتياز جدار الخلية والارتباط بغشاء الخلية المستهدفة (Walsh et al., 2019).

يتרכب الامفوترسين الشحمي من اتحاد الامفوترسين B مع الكوليسترول والدهون الفسفورية الأخرى داخل جسم شحمي صغير احادي الصف. ويرتبط هذا الدواء مع اركستيرول الطفيلي مما يتسبب بتعطيل الغشاء الخلوي له وحدوث اختراق فعال ومستويات ثابتة في الانسجة ولاسيما الكبد والطحال واستقرار في الدم والانسجة الضامة ووجود الكوليسترول في الجسم الشحمي يقلل من تفاعل الادوية مع غشاء خلايا الثدييات ومن ثم يقلل من الجرعات الأولية الأعلى من 5 ملغم/ كغم توفير اختراق أفضل واستمرارية اطول للانسجة من الجرعات المنخفضة المتكررة مع زيادة في مستوى الكرياتينين وقد لاحظ أنه السمية الحادة والمزمنة غير شائعة حتى مع الجرعات التي تصل الى اعلى من 15 ملغم/ كغم ولكن التغير في درجات الحرارة أكبر من 25 م° او أقل من 0 درجة مئوية سيغير خصائص الجسم الشحمي ويزيد من سميته او يقلل فعاليتها (Saravolatz et al., 2006) وقد يتم امتصاص هذا المركب من الخلايا البلعمية الكبدية Hepatic macrophages إذ توجد طفيليات الشمانيا ويجب مراقبة مستوى البوتاسيوم K^{+} في الدم في اثناء فترة العلاج بهذا المركب لان انخفاضه يسبب اعتلال القلب. كما يجب حفظ المركب في درجة حرارة 25م° اثناء النقل والتخزين لأن تغير درجة الحرارة من المحتمل أن يفقد المركب سلامته التركيبية الدهنية ومن عيوب هذا العلاج تكلفته العالية (Tamiru et al., 2016).

7.8.2 عقار الثاليدومايد (Thalidomide)

اكتشف هذا العقار في سنة 1950 وتم اعطاؤه كعلاج للحوامل لحالات الغثيان ولكن بعد فترة لوحظ ظهور تشوهات في اطراف الأطفال الذين تناولت امهاتهم الثاليدومايد كمهدئ خلال فترة الحمل مما نتج عنه تشوهات خلقية فيما بعد ومنها ظاهرة تقزم الأطراف للأطفال المولودين وتم سحبه من الأسواق وتم معاقبة الشركة المصنعة ولكنه مهم كونه عقاراً فموياً يستخدم لعلاج عديد من الامراض

السرطانية وعامل النخر الورمي (TNF- α) Tumour Necrosis factor وعدد من الأمراض الجلدية بما في ذلك مضاعفات مرض الجذام (ENL) Erythema Nodosum Leprosum ويعد معدلاً مناعياً جيداً في الحالات المرتبطة بفيروس نقص المناعة المكتسبة، يستعمل كمضاد للالتهابات وللمرضى الذين يعانون من ضعف وظائف نخاع العظمي (Upputuri *et al.*, 2020). يتكون الثاليدومايد من الكلوتاميك اسيد (alpha-N-phthalimido-glutarimide) والتركيب الكيميائي له $C_{13}H_{10}N_2O_4$ يمتص ببطء بعد تناوله عن طريق الفم بعد 2 - 6 ساعة. يتوزع في سوائل الجسم وأنسجته جميعها مع تراكيز أعلى في الجلد والكلية. تتراوح الجرعة بحسب الحالة للبالغين ما بين 50 - 100 ملغم/كغم/يوم وفي بعض الحالات تصل الى 400 - 1000 ملغم/كغم/يوم وفي الاطفال من 3 - 9.5 ملغم/كغم/يوم يعطى مع ادوية أخرى لتقليل اثاره السامة ويحذر من إعطائه للحوامل (Hassan *et al.*, 2015).



الشكل (14): الصيغة الكيميائية لعقار الثاليدومايد

وجد أن معدل الاستجابة لعلاج الثاليدومايد بالنسبة للأمراض الجلدية ما يقرب 90% ولبعض الحالات الخاصة المقاومة للعلاج بما في ذلك مرض القرحة القلاعي Aphthous ulceration المصاحب لفيروس نقص المناعة HIV، مرض بهجت Behcet disease ، الذؤابة الحمامية (الجذام) Erythema Nodosum Leprosum (ENL)، والفقاخ الفموي Oral bullous، وتقرح الغشاء المخاطي Mucous membrane disorders، سرطان البنكرياس، البروستات، الرئة، تثبيط تكوين الاوعية الدموية Antiangiogenic تكاثر الخلايا وتعزيز الموت المبرمج للخلايا Apoptosis ووجد أنه يثبط بروتين الكاينيز AKT وفوسفونيوسيتين كما يعمل على تثبيط الانجذاب الكيميائي للخلايا للمفاوية والعدلات وتثبيط البلعمة بواسطة العدلات الضامة

يقلل من مستويات الساييتوكينات المنشطة للالتهابات وعامل النخر الفا وانترفيرون كاما (Zhu *et al.*, 2021; Sherbet, 2015) يزيد من عدد خلايا T-helper، يقلل من الخلايا التائية كما يقلل من نسبة T-helper CD4 الى T-suppressor CD8 (Hassan *et al.*, 2015).

9.2 المسارات المستهدفة في الطفيليات لتطوير الادوية

The Parasites Pathways Target For Development Drugs

يحتاج تطوير العقاقير والادوية الخاصة بالطفيليات الى مسارات ايضية عديدة Metabolic pathways منها مسار انزيم Glyoxalase للطفيليات والاولي ويعد هدفاً جيداً للعلاج الكيميائي والاعتماد في الطفيلي على وجود Dithiol-Trypanothione لازالة السمية ولحماية الخلايا من المنتجات الثانوية السامة لعملية التمثيل الغذائي. (Sousa *et al.*, 2013;) TryR Trypanothione reductase هو الانزيم الوحيد الذي يربط NADPH and thiol-based redox systems في الطفيليات ويتعلق بـ H-TrxR Thioredoxin الذي يشترك في عديد من الخصائص الفيزيائية والكيميائية مع GR. TryR الذي لديه صفات بايوكيميائية لـ *T. brucei*, *T. cruzi* و *Leishmania* (Andrade and Reed, 2015) وقد تم تحديد العديد من الأهداف الواعدة التي هي اساس في علم الوراثة وتعتمد على تحديد البروتينات بشكل اساسي في أنواع اللشمانيا والتريبانوسوما مثل عامل الاستطالة (eEF2) وبناء الـ tRNA الـ Phenylalanine وبناء (IRscytoplasmic isoleucine) و pfATP4 و P-typecation- ATPase وبناء الـ lysyl tRNA و dehydrogenase و Cytochrome bc1 و dihydroorotate وفي اللشمانيا Cycline-dependent kinase و CDK12 (Cowell and Winzeler, 2019).

ومسار تحلل الكلوكوز glycolysis (Dias *et al.*, 2009) كما ان انزيم p-type ATPase وهو انزيم خاص لعملية تنظيم دخول وخروج الايونات بالغشاء الخلوي للشمانيا (Meade, 2019) كما بين (Meier *et al.*, 2018) ان ATP4 يؤدي دوراً مهماً في نشاط مضخة ايونات الصوديوم عبر الغشاء الخلوي فتموت الخلية بفقدان ATP4 فعاليتها عندما يصبح الساييتوسول حامضي، انتقاعاً بزيادة الازموزية، تدهوراً في القدرة الكهروكيميائية او الارتباط بادوية غير معروفة.

انزيم SQS Squalene الذي يحفز الستيرول Sterol احدى المكونات المهمة في غشاء الخلية لطفيلي اللشمانيا اذ يختزل تثبيط هذا الانزيم مستوى الستيرول وبالتالي يوقف تكاثر الطفيلي.

تفتقر اللشمانيا لنظام تصنيع نيوكليوتيدات البيورين الجديدة فتعتمد على المضيف في نقل البيورين منه الى غشاء خلية الطفيلي بواسطة ناقلات النيوكليوتيدات LdNT1 و LdNT2 الموجودة في طور المسوط وغير المسوط في الغشاء (Chawla and Madhubala, 2010).

يعد انزيمي Adenylosuccinatelyase ADSL و IMPDH Inosine-5-monophosphate dehydrogenase splate كليهما مهمان لصنع شبكة البروتينيز PPI Protein Protein Interaction ثلاثي الابعاد المهم في انقاذ مسار البيورين من جدار خلية المضيف (Bora and Jha, 2020).

انزيم ارجينييز Arginase يقع هذا الانزيم في الـ Glycosome عضوية تحت خلوية لطفيلي اللشمانيا وأن تثبيط مساره يؤدي الى تثبيط مسار البناء الحيوي للامينات المتعدد ومن ثم يؤثر على غشاء اللشمانيا (Silva et al., 2015 ; Takele et al., 2013).

10.2 تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) Polymerase Chain Reaction

تعد هذه التقنية من التطبيقات البيولوجية الخلوية والجزيئية الحديثة وتستخدم في مجال التقنيات المناعية والجزيئية المتقدمة، التي تسمح في غضون ساعات قليلة بتشخيص الاحماض النووية DNA و RNA، تركيب البروتينات ووظائفها، المسارات الايضية، الالتهابات، تشخيص الاورام وعلاجها ويستخدم استنساخ الـ DNA و RNA للكشف عن محدد يعين في الكائن بالبصمة الجينية مثلاً لشخص في سياق تحقيق قضائي او تحديد اصناف حيوانية او نباتية او جرثومية حتى في اختيار جودة الطعام او اختيار الأصناف ولا يزال تفاعل البوليمراز المتسلسل ضرورياً لمعرفة التسلسلات الجينية والطفورات الذي يستخدم في تشخيص الفايروسات، والبكتريا، والطفيليات والفطريات.

تعتمد فكرة تفاعل البلمرة على تضخيم التسلسلات من الـ DNA او الـ RNA بعد استخلاصها من خلايا او سوائل الجسم عن بخطوات متكررة خارج الجسم الحي *In vitro*. وهي تقريباً تلك نفسها التي تحدث في داخل الجسم الحي (Ehtisham et al., 2016).

1.10.2 المكونات الاساسية لتفاعل البلمرة (PCR) Essential Component of Reaction

1.1.10.2 DNA القالب Template DNA

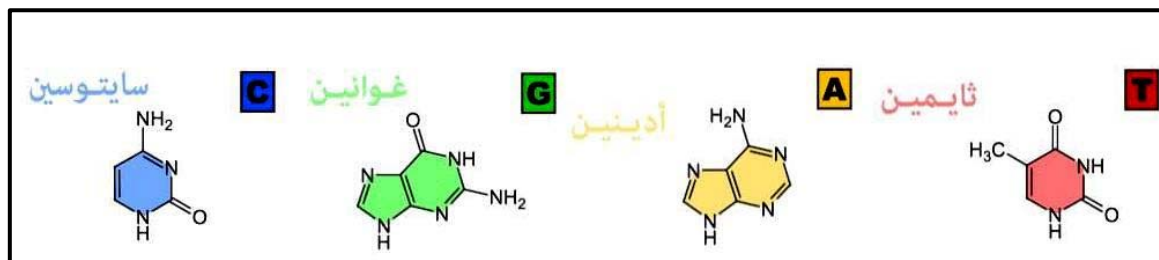
هو الـ DNA المراد تضخيمه وهو شريط حلزوني مزدوج عند التضخيم سوف يفك الازدواج لينشأ القالب المكمل لأحد الشريطين الذي يحمل القواعد النتروجينية المكملة لأحد الشريطين (Clancy, 2008) فيتكامل كل شريط مع المتمم له وبقواعد نتروجينية خاصة مثلاً يلتقي الادنين A

مع الثايمين T والسايروسين C مع الكوانين G. وبهذا نحصل على جزيئين من الـ DNA كل منهما مطابق الجزء الاصلي تماماً وتمتلك خواصه الوراثية نفسها فمثلاً 3ACCGAT5 الشريط المكمل له يقرأ شكل 5TGGCTA3 وتكون عملية فك الارتباط بواسطة انزيم البوليميريز DNA Polymerase (Al-Rubaie, 2012). وقد يتطلب التفاعل من 100 – 500 نانوغرام منه.

2.1.10.2 البادئات Primers

هي نيوكليوتيدات قصيرة او قليلة Short or Oligonucleotide يبلغ الطول المناسب لها ما بين 18 – 30 قاعدة وتعتمد نوعية التضخيم على طول البادئة ودرجة الحرارة فكلما كانت البادئة اقصر زادت كفاءة ارتباطها بالهدف. وأن Melting Temperature (TM) هي الحرارة المسؤولة عن كسر الاواصر الهيدروجينية ومسح الـ DNA أذ يصبح بشكل اشربة مفردة ويمكن استعمال معادلة Wallace لحسابها.

$$TM = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$



الشكل (15): القواعد النيتروجينية

ويجب تجنب التسلسلات المكررة ضمن البادئ الواحد او بين بادئين تجنباً لتكوين Dimer مما يؤثر على فعالية البلمرة (Garibyan and Avashia, 2013; Metzker and Caskey, 2009).

3.1.10.2 انزيم البلمرة DNA Polymerase

يعد مفتاح الانزيمات الضرورية والمهمة لعملية التضاعف الجيني للخلايا الحية جميعها وللغايروسات. وتتمثل وظيفته في تصنيع الحمض النووي من ديوكسي رايبونوكليوتيدات ثلاثي الفوسفات. يتم انشاء النسخ الجديدة عن طريق اقتران النيوكليوتيدات بقواعد موجودة على كل خيط من جزء الحمض النووي الاصلي ويحدث الاقتران دائماً مع مجموعة محددة في السايروسين والكوانين والادنين والثايمين وربطهما مع بعضها باواصر Phosphodiester. ويمتاز هذا الانزيم بمقاومة الحرارة العالية فيبقى ثابتاً عند درجة حرارة المسح (94 – 95 م°) ولحظ أنه يعمل بمدى حراري يتراوح

ومن انزيمات البلمرة هي Taq DNA polymerase الذي تم عزله من بكتريا الينابيع الحارة *Thermus aquaticus*. ويستخدم في التفاعل الحاوي على 25 - 50 مايكروليتر ما يقرب من 0.25-0.5 وحدة من هذا الإنزيم (Redrejo-Rodriguez *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2015).

Deoxynucleoside Triphosphate

5.1.10.2 الأيونات موجبة ثنائية التكافؤ Divalent Cations

6.1.10.2 Buffer Solutions المحاليل المنظمة

7.1.10.2 المبلر الحرارى P.C.R Thermo cycler

المعالجات الحرارية أو اجهزة التدوير الحرارية هي أدوات تستخدم لتضخيم عينات الحمض النووي الرايبوزي بتفاعل البلميريز المتسلسل ويقوم الجهاز برفع درجة الحرارة للعينات وخفضها في خطوات منفصلة ومبرمجة مسبقاً مما يسمح نسخ العينات واعادة ربطها بكواشف مختلفة ويمكن استخدام المواد الوراثية المضخمة في عديد من التطبيقات مثل الاستنساخ والتسلسل والتحليل والتعبير

والتنميط الجيني فضلاً عن الغطاء الحراري الذي يساعد في مزج مكونات التفاعل في كل انبوبة (Rice, 2021).

2.10.2 مراحل تفاعل البلمرة P.C.R Reaction Stages

وتكون على ثلاث مراحل (Nettles *et al.*, 2021) وهي:

1.2.10.2 مرحلة المسخ Denaturation

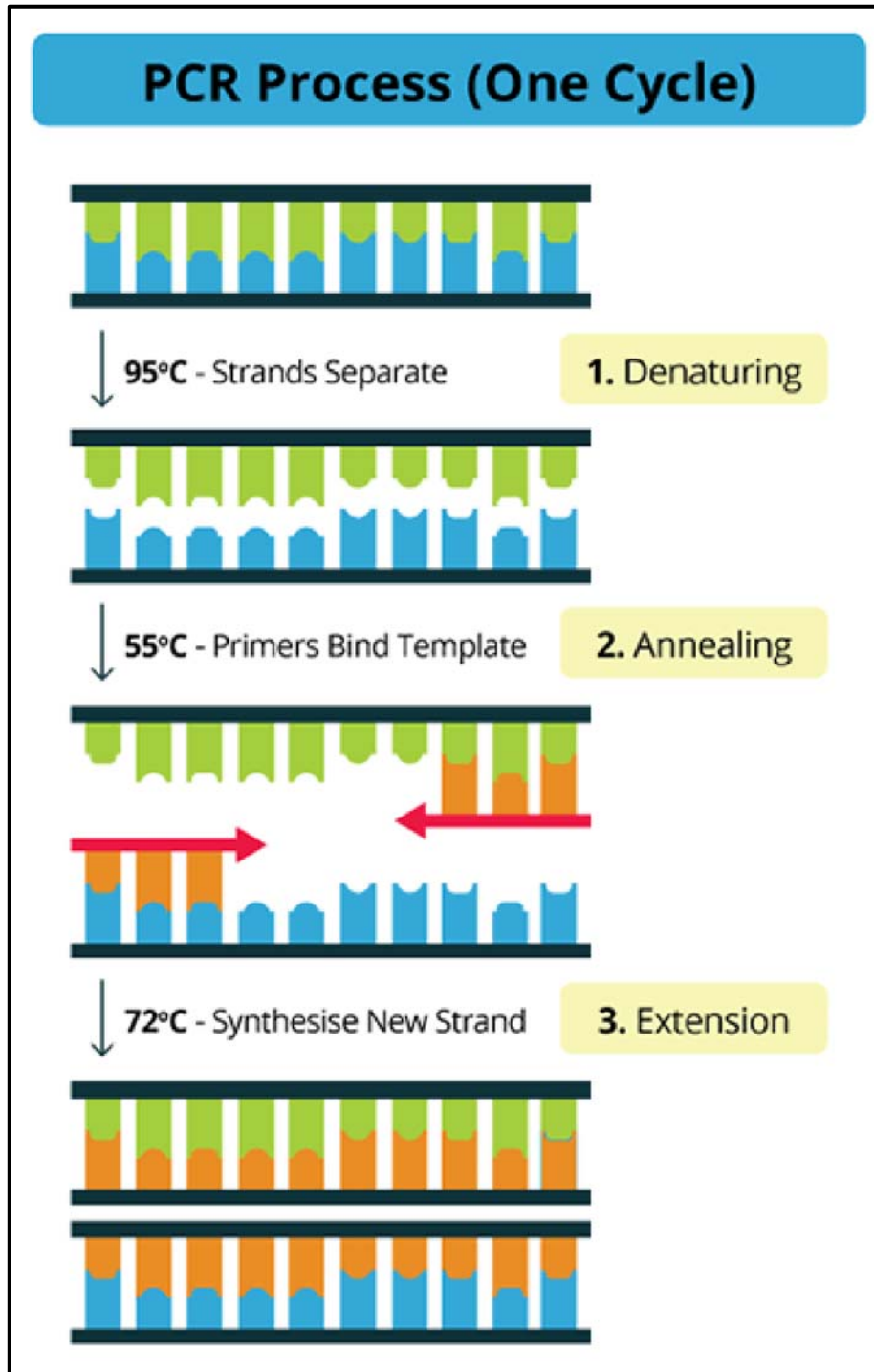
تسمى هذه المرحلة بمرحلة مسخ الحمض النووي الذي يتكون من خيط مزدوج اذ تتم عملية فك الارتباط الخيطي كل على حده بشكل خيطين منفردين عن طريق تسخين المحلول لدرجة 95م° تقريباً عند 30 دورة لمدة 5 دقائق على الأقل تتسبب الحرارة في كسر الروابط الهيدروجينية التي تربط خيوط الـ DNA بعضها مع البعض الآخر ويبقى انزيم Taq polymerase عند هذه الدرجة ثابتاً ونحتاج الى مدة 45 ثانية للمسخ الضمني عند الحرارة نفسها التي تحتوي على 55% من قواعد الـ C-G أما T-A فنحتاج الى درجات حرارة أقل ووقت اقصر.

2.2.10.2 مرحلة الارتباط Annealing

تعتمد هذه المرحلة على درجة الحرارة اذ ان خفض درجة الحرارة بصورة تدريجية وبطيء إذ تتراوح ما بين (55 - 65 م°) اعتماداً على تسلسل البادئ وطوله فأذا كانت درجة الحرارة عالية سوف تضعف الارتباط وتقلل من التضخم للـ DNA واذا كانت واطئة قد يحدث الارتباط ولكن غير متخصص وتولد قطع غير مرغوب فيها من الدنا.

3.2.10.2 مرحلة الاستطالة Extension

يعمل انزيم البوليميريز على بناء السلاسل الجديدة المكملة للخيوط المنفصلة للدنا بتحفيز البادئات للارتباط بالقالب وانتاج القواعد النتروجينية المكملة للاشرطة المفردة وعند درجة حرارة ما يقرب من 72م° يضاف ما يقارب 2000 نيوكليوتيدات كل دقيقة.



الشكل (16): مراحل تفاعل البلمرة PCR reaction stages

3.10.2 عدد الدورات Cycle Numbers

أن عدد الدورات يعتمد على عدد النسخ التي تنتج من تفاعل البلمرة فإذا كان عدد النسخ 10^5 فهو يحتاج إلى 25 دورة لكي يظهر الناتج في هلام الاكاروز أما إذا كان عدد النسخ 10^4 فالدورات

30 دورة و 10^3 تحتاج الى 35 دورة أما 10^2 تحتاج الى 40 دورة بالاعتماد على تسلسلات الدنا القالب وعلى كفاءة استطالة البادئ (Dennis-Lo et al., 2006).

11.2 المورثات وتباين التعبير المورث

Genes and Heterogeneity of Gene Expression

يسمى التباين في التعبير الجيني بين الخلايا الفردية المتطابقة وراثياً بـ (ضوضاء التعبير الجيني) والتي ينتج عنها بشكل مباشر تنوع النمط المظهري وهذا الاختلاف يؤدي الى عدم استقرار الجينوم وبالتالي يساهم في تباين النمط الجيني. وهذا التغير في اجزاء من القواعد النتروجينية والمسؤولة عن انتاج تعبيرات بروتينية خاصة يؤدي الى احداث تلف للحامض النووي وانتاج تعبيرات بروتينية مغايرة محدثاً ما يسمى بالطفرة Mutation وانتاج بروتينات غير فعالة غير قادرة على مقاومة المرض (Liu et al., 2019).

ويعرف التعبير المورث أنه عملية دقيقة واساسية في جميع الخلايا الحية ويتحكم بعملية تدفق دقيق للمعلومات الجينية من الحامض النووي الى الحامض النووي الرايبوزي الى البروتين (Evans et al., 2018).

12.2 مورثات اللشمانيا Leishmanial Genome

ينتمي طفيلي اللشمانيا الى عائلة المثقبيات ويوجد في 88 دولة في العالم ولقد وجد أنه يتكون من 36 كروموسوم حسب احصائيات العالم القديم و 34 او 35 كروموسوم في العالم الحديث. وفي الجينوم الاحادي لقد تم الكشف عن وجود 32800000 وحدة في 36 كروموسوم في طفيلي اللشمانيا و RNA 911 و 8272 مورث كاذب (Kazemi, 2011). وأن التقدم الملحوظ في علم البايولوجي الجزيئي والفحص الدقيق للمورثات المشفرة للبروتين سمح بتحديد عدد صغير نسبياً من المورثات الخاصة بالأنواع والكشف عنها. وأن عدد المورثات يختلف حسب الأنواع فيبلغ حجم المورثات لـ *L. amazonensis* بـ 29Mb و 33Mb لكل من *L. infantum* و *L. braziliensis* وتختلف عدد الكروموسومات ايضاً فيبلغ 34 لـ *L. mexicana* و *L. amazonensis* و 35 لـ *L. braziliensis* و 36 لـ *L. donovani* و *L. major* و *L. infantum* (Cantacessi et al., 2015) هذه الاكتشافات كلها كانت سبباً في تطوير علاج اللشمانيا للحد من انتشارها.

ومن ضمن المورثات التي تناولتها دراستنا هي المورثات التي تتعلق ببروتينات الاغشية والطور المسوط في اللشمانيا، والطاقة، والايض والسلسلة التنفسية.

1.12.2 المورث المشفر *KMPH Kinetoplastid*

يعد البروتين الموجود في غشاء الجزء الحركي الـ Kinetoplast هو من مميزات رتبة Kinetoplastidea فيظهر الـ *KMPH* في كلتا مراحل حياة طفيلي اللشمانيا Promastigote و Amastigote ولقد ثبت أنه يقترن مع الهيكل الغشائي لسطح الخلية والجيب السوطي والحوصلات داخل الخلايا وثبت أنه التعبير المورث في الطور غير المسوط يكون أعلى من الطور المسوط مما يدل على أن لهذا المورث دور مهم في علاقة المضيف بالطفيلي (Evans *et al.*, 2018).

لقد وجد أن هذا البروتين يحتوي على كميات كبيرة من الحامض الأميني التريبتوفان الذي يوجد بالقرب من الأسطح الدهنية المحبة للماء Lipid-water inter face وحدوث أي خلل أو طفرة في البروتين سوف يتجه الحامض الأميني نحو مركز البروتين ويحلله كلياً أو جزئياً ويعمل على تغيير خصائص الغشاء (Sannigrahi *et al.*, 2017).

ووجد أن *KMPH* موجود في بروتين معقد يرتبط بـ Lipophosphoglycan وهو الأساس في سطح الطور المسوط لطفيلي اللشمانيا بعد تحديد أن خلايا الـ T Cell تستجيب لـ Lipophosphoglycan المرتبط بالبروتين (Meriee *et al.*, 2014).

أوضحت الدراسات بأن هذا المورث يُعد هدفاً للعلاج المناعي Immunotherapy والتحصين Immunization لقدرته على تحفيز خلايا بيتا B-Cells المساعدة في انتشار الخلايا للمفاوية والاستجابة للسموم الخلوية Cytotoxic التي تنتج عن الحيوانات المختبرية في طفيلي اللشمانيا (Dalimi and Nasiri, 2016).

2.12.2 المورث المشفر *ND1 Mitochondrial Gene*

تعود اللشمانيا إلى رتبة المتقنيات Trypanosomata وهي إحدى أهم الكائنات الحية ذات الأهمية الطبية (Lukes *et al.*, 2018) وأن المعدل التطوري السريع للحمض النووي للميتوكوندريا التي يوجد فيها الـ *ND1* يجعله هدفاً مثالياً لدراسات علم الوراثة ومصدراً للسمات الموروثة لأنواع وللد من انتشار الطفيلي (Camacho *et al.*, 2019)، وتمتاز اللشمانيا بوجود شبكة من الـ DNA ضخمة تقع داخل الميتوكوندريا تعرف باسم KDNA أو Kinetoplast، وتتكون من نوعين من الدوائر الأولى تسمى القصوى Maxicircle وتتراوح أحجامها بين 20 - 40 كيلوبايث وعددها بالعشرات أما الثانية فتسمى بالصغرى Minicircles ويتراوح حجمها ما بين 0.5 - 2 كيلوبايث وتتوجه عديد من الأيونات من الدائرة القصوى إلى الدائرة الصغرى وتقوم بتحرير الحمض النووي الرايبوزي للميتوكوندريا (gRNAs) وهذه العملية معقدة وتحتاج إلى عديد من البروتينات والانزيمات وادخال وحذف اليوريدين - U (Simpson *et al.*, 2015 ; Jensen and Englund, 2012) وفي حالة فقدان واحدة من الدوائر الصغيرة مما يؤدي ذلك إلى موت خلية الطفيلي (Read *et al.*, 2016).

وقد يتم تكرار الدوائر الصغيرة بطريقة منتظمة وربط الـ (kdNA) بمناطق متقابلة للشبكة وبمجرد تضاعف حجم الشبكة تنقسم الماييتوكوندرية على قسمين لتكون ماييتوكوندرية جديدة (بنوية) (Esther et al., 2019) يعد الـ dehydrogenase subunit1 (NADH) الانزيم الأكبر والأكثر تعقيداً في السلسلة التنفسية للماييتوكوندرية ويقترن وجوده بنقل الالكترونات من دون البروتونات غير الغشاء الداخلي للماييتوكوندرية. وتتضمن الآلية تغير التشكيل والتفاعلات الكهروستاتيكية وجزيئات الماء (Grba and Hirst, 2020).

يحتوي الحمض النووي DNA الماييتوكوندرية على 8 مواقع معقدة مشفرة وهي وحدات ثانوية من $ND1 - ND5$ وهي مهمة في تقويم هيكل الماييتوكوندرية وتشارك في ضخ البروتونات وترتبط بـ ابيكيونين وروتينين في حين ان $ND7 - ND9$ مهمين في بناء هيكل النواة الحاوي على الوحدات الثانوية المشفرة $NDUFS2$ (Fe-S) العنقودية التي ترتبط بمواقع اللابيكينين) وقد وجد أن $ND1$ ، $ND2$ ، $ND4$ ، $ND5$ توجد في الغشاء الداخلي للماييتوكوندرية وتشارك في ضخ الالكترونات وأن غشاء الماييتوكوندرية في الـ Kinetoplastia يحتوي على 14 وحدة فرعية في حين يوجد في اللبائن 32 وقد تشارك هذه الوحدات في تنظيم النشاط الانزيمي واستقرار الوظائف المعقدة وتساعد على تخليق الامراض الدهنية، وقد اكتشف أن الحلقة القصوى في *L. donovani* وجود سلسلة IsdBob هي سمة بارزة تحتوي على مورثات مرتبة بشكل منظم ولوحظ اندماج $ND1$ الجين المشفر في الحلقة الصغيرة، تشارك في ضخ البروتونات بغشاء الماييتوكوندرية تم في ذلك تحرير mRNAs للماييتوكوندرية ويتبعها انماط اليوردين والبروتين الرايبوسومي ($RPS12$) S12 وانتاج عناصر التنفس الخلوي المعقدة V و IV و III وفقدان تحرير Cryptogenes $ND9$ و $ND8$ و $ND3$ و G3 و G4 (Cermakova et al., 2021). لذا يعد مورث $ND1$ هدفاً مميزاً لانتاج دواء فعال ضد الطفيلي لأنه يرتبط بغشاء الماييتوكوندرية وعملية التنفس الخلوي ثم تخليق البروتينات.

3.12.2 السلسلة الداخلية المستنسخة ITS1-IS

تم وصف طريقة عالمية للتشخيص المباشر للمظاهر السريرية والبيئية تستعمل هذه الطريقة وتطبق لتحديد النوع عندما يوجد أكثر من نوع واحد من الطفيليات ذات الصلة بعلم الامراض. وهي طريقة تستهدف المنطقة الفاصلة في السلسلة الداخلية المستنسخة ($ITS1$) PCR S1 و SSU 5.8 لـ rRNA (12) وهي طريقة مهمة لتمييز الأنواع عن بعضها بتسلسل الحمض النووي او تحليل انزيم التعقيد لمنتج تعدد الاشكال لطول جزء تقيد تفاعل البوليميراز المتسلسل للتعرف على الأنواع (Toz et al., 2013).

تستخدم S18 وهي وحدة فرعية رايبوسومية نووية من rRNA ومورثات داخلية كهدفاً مهماً في تشخيص اللشمانيا فاصلاً في سلسلة $ITS1$ للجينات (Filgueira et al., 2020). تكون مورثات

الـ RNA (rRNA) متكررة ومحفوظة ضمن سلاسل الـ *ITS1* ويكون موقع الـ *ITS1* بين 18S rRNA و 5.8S rRNA مورث ويكفي تعدد الاشكال لتسهيل PCR ليكون بمثابة هدف للاقتزان مع تحليل *ITS1*-PCR وتمييز الأنواع ويستخدم كذلك بتداخله مع فحص RFLP مع انزيمات التقيد المختلفة من *Sau3AL*، *RsaI*، *HhaI*، *AluI*، *Bstul*، *EcoRI*، *FspI*، *HaeIII*، *TaqI* و *SphI*.

يعد *HaeIII* هو الانزيم الأكثر استخداماً للتشخيص الدقيق لأنواع اللشمانيا ويستعمل *ITS1* PCR-RFLP او انزيم *HaeIII* بشكل واسع للتشخيص المباشر للشمانيا العالم القديم (Guerbouj *et al.*, 2014).

استعمال سلسلة *ITS1* وجينات الـ DNA الرايبوسومي التي تقع بين 5.8S و 18S لتشخيص أنواع اللشمانيا على الرغم من ان الشفرات المحيطة غير معرضة للاستساخ ولتحديد الأنواع الداخلية بدقة (Shafiei *et al.*, 2021).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3 الأجهزة المستعملة Apparatuses Uses

جدول (1) الأجهزة المختبرية المستعملة

الأجهزة	اسم الجهاز مع مكان الصنع
حاضنة	Incubator (BINDER), GmbH, Germany
المعقم (الموصدة)	Autoclave (Gallen kamp), U.K
ثلاجة	Refrigerator (ConcoRD), Lebaron
مجمدة	Freezer (Argelik), Turkey
حمام مائي	Water Bath (Gallen Kamp), U.K
جهاز قياس الدالة الحامضية	pH meter (OAKTON), U.S.A
ماصات دقيقة مايكروية	Micropipettes (100 - 1000), (20 - 200) Ml ZonGTAI, Taiwan
مجهر ضوئي	Light Microscope (OLYMPUS) Japan
جهاز الطرد المركزي المبرد	Cooled Centrifuge (Centurion Scientific K3 Series, U.S.A)
مجهر ضوئي مزود بكاميرا تصوير	Microscope with Camera (OPTIKA, ITALY)
ميزان حساس	Analytical Balance (KERNPFB, Germany)
جهاز الترحيل الكهربائي	Electrophoresis (EFD – 300, U.S.A)
جهاز الهزاز	Vortex Mixer, Germany
جهاز المبلمر الحراري	Thermocycler, Germany
جهاز الطرد المركزي الدقيق	Microfuge, U.K
المحرك المغناطيسي الحراري	Heating Magnetic Stirrer U.K
جهاز الاشعة فوق البنفسجية	U.V. (Transilluminator – Msmagor Science U.S.A)
مجهر القوة للهجرة الكهربائية	Electrophoresis – Power Supply, U.S.A

2.3 الكائنات المستخدمة Organisms Uses

تم الحصول على سلالتين من طفيلي اللشمانيا المحلية في هذه الدراسة هما *L. tropica* و *L. donovani* من مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين / بغداد. والمشفحة جزيئياً باستخدام تقنية الـ PCR.

3.3 تحضير الوسط الزرعي Preparation of Medium

1.3.3 وسط توبي Tobie's Medium

تمت تنمية طفيلي اللشمانيا في وسط Tobie's (Tobie et al., 1950) الذي يتكون من طورين هما: الطور الأول هو الطور الصلب والمضاف اليه اكار الدم Blood agar، والطور الثاني هو الطور السائل Lock's Solution ويتكون هذان الوسطان مما يأتي:

أ. جدول (2) الوسط الصلب Solid Medium

1.5 g	Meat Extract (Oxoid)	خلاصة اللحم
2.5 g	Bacteriological Pepton (Oxoid)	بيتون
4.0 g	Sodium Chloride, NaCl	كلوريد الصوديوم
7.5 g	Agar	اكار
500 ml	Distilled Water	ماء مقطر
200, 000 IU	Grystalline Penicilline	بنسلين بلوري
200 mg	Streptomycin Sulfate	سلفات الستربتومايسين

طريقة التحضير:

تذاب جميع المواد المذكورة انفاً، عدا المضادات الحيوية في ماء مقطر ثم يعاير الاس الهيدروجيني pH ما بين 7.2 – 7.4 باستخدام جهاز الـ pH meter باستخدام هيدروكسيد الصوديوم NaOH وحامض الهيدروكلوريك HCl ويعقم بالمعقم Autoclave لمدة (15 – 20) دقيقة تحت ضغط جوي 1 ودرجة حرارة 121 م°. يترك المحلول ليبرد الى درجة 45 م° ثم يضاف له الدم فصيلة O⁻ المثبط والمضادات الحيوية Antibiotics

ب. جدول (3) الوسط السائل Liquid Medium

8.0 g	Sodium Chloride, NaCl	كلوريد الصوديوم
0.2 g	Potassium Chloride, KCl	كلوريد البوتاسيوم
0.2 g	Calcium Chloride, CaCl ₂	كلوريد الكالسيوم
0.3 g	Potassium dihydrogen phosphate KH ₂ PO ₄	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
2.5 g	Glucose	كلوكوز
1000 ml	Distilled Water	ماء مقطر
200.000 IU	Crystalline Penicilline	بنسلين بلوري
200 mg	Streptomycin Sulfate	سلفات الستربتومايسين

طريقة التحضير:

تذاب المحتويات في الماء المقطر عدا المضادات الحيوية ثم يعاير الاس الهيدروجيني الـ pH بجهاز الـ pH meter ما بين (7.2 – 7.4) ويعقم بجهاز المعقم Autoclave لمدة (15 – 20) دقيقة تحت ضغط جوي 1 ودرجة حرارة 121 م° ويترك ليبرد لدرجة 45 م° من ثم يضاف اليه المضادات الحيوية. Antibiotic.

2.3.3 مصدر الدم Blood Provenience

استخدم دم الانسان فصيلة O⁻ بدل دم الارنب في تحضير الوسط الصلب المستخدم في التجارب، وتم الحصول عليه من مصرف الدم لبعض المستشفيات في مدينة الموصل وحفظ في درجة 4 م°.

3.3.3 تحضير الوسط كاملاً Preparation of Complete Media

يتم اضافة (15) مل من دم الانسان المثبط Inactivated Human Blood بدرجة حرارة (56) م° ولمدة (30) دقيقة الى (85) مل من محلول الوسط الصلب الاساسي بنسبة (15%). ثم يوزع بواقع 5 مل في قناني زجاجية (Mc Cantry vials) معقمة سعتها (30) مل ومن ثم توضع بصورة مائلة Slant Position وتترك لتصلب، ثم يضاف اليها 2 مل من محلول الوك Lock's Solution عند الاستخدام.

نحتاج فيما بعد لغرض اجراء التجارب الجزيئية الى كميات كبيرة من الطفيليات لذا تم توزيع الوسط الصلب على دوارق (Flasks) معقمة سعتها 250 مل بواقع 50 مل لكل دورق مع اضافة 20 مل من الوسط السائل عند الاستخدام.

4.3 تنمية وحساب عدد بروماستكوت اللشمانيا بنوعيهما اللشمانيا الجلدية واللشمانيا الاحشائية.

Cultivation and estimation number of two leishmania parasites *L. tropica* and *L. donovani*.

تم اضافة 1.9 مل من الوسط السائل المحضر في ظروف معقمة الى 5 مل من الوسط الصلب المائل في قناني سعتها 30 مل. أضيف بعد ذلك 0.1 مل في بروماستكوت اللشمانيا المأخوذة من المزارع الاصلية Stock culture عند الطور اللوغارتمي Log phase وبعدد ابتدائي 2×10^5 طفيلي/ مل ثم تحضن لمدة 4 أيام بدرجة حرارة 26 م°.

تم حساب عدد الطفيليات ذلك بأخذ (0.5 - 1) مل من المزرعة وتثبت بالفورمالين باضافة قطرة او قطرتين منه الى الطفيليات المسحوبة في ظروف معقمة تجنباً لحدوث التلوث ثم يخفف النمو اذا كان كثيفاً بالمحلول الفسيولوجي 0.9% Normal Salin ثم العد باستخدام شريحة الـ Haemocytometer (Garcia and Ardila., 2009; AL- Chalabi.,1975).

5.3 تحضير معلق الطفيلي Preparation of the Parasite Suspension

تم جمع الطفيليات عندما كانت بالطور اللوغارتمي باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (12000) دورة/ دقيقة لمدة (10) دقائق وبدرجة (4 م°) ثم تغسل الخلايا ثلاث مرات بمحلول (PBS) Phosphate Buffer Saline المحضر بدالة حامضية 7.4 ثم تعلق بتركيز 10^9 طفيلي/ مل.

6.3 تحضير تراكيز الادوية المستخدمة

Preparation of Drugs Concentration Uses

1.6.3 تحضير عقار الـ (Thalidomide (Thalix - 100

تم الحصول على عقار الثاليدومايد من الصيدلية المحلية بشكل كبسول بتركيز 100 ملغم والمصنع من شركة Fresenius kabi الهندية، اذ تم اذابة 0.224 ملغم بما يعادل نصف وزن باوذر

الكبسولة الواحدة وإضافة 10 مل من المحلول الفسيولوجي 0.9% بظروف معقمة للحصول على تركيز 5000 مايكروغرام/مل ثم يؤخذ 1 مل من هذا التركيز وإضيف إليه 4 مل من المحلول الفسيولوجي 0.9% Normal Salin للحصول على الـ (Stock Solution) ومنه حضرت التراكيز التي نحتاجها لإجراء التجارب وهي (0.25، 0.5، 1، 2، 2.5، 5، 10، 12.5، 15، 20، 25، 30) مايكروغرام/مل سواء استخدم العقار لوحده أو بشكل متزامن مع العقار الآخر.

2.6.3 تحضير عقار الـ (Liposomal Amphotericin B (Ambisome)

تم الحصول على عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب من الصيدلية المحلية بشكل امبولات وبتراكيز 50 ملغم والمصنع من قبل شركة Ireland drugs company. اذ تم وزن 0.01 ملغم من باودر الوزن الكلي الذي كان 5 ملغم للامفوترسين اللايبوسومي ب وإضيف الى 10 مل من المحلول الفسيولوجي للحصول على تركيز 1000 مايكروغرام/مل والذي اعتبر لـ (Stock Solution) وفي ظروف معقمة ومن ثم حضرت بقية التراكيز المستخدمة وهي (0.25، 0.5، 1، 2، 2.5، 5، 10، 12.5، 15، 20، 25، 30) مايكروغرام/مل.

3.6.3 تحضير العقارين بصورة تازيرية Synergistic preparation of the two drugs

تم في البداية تثبيت عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وغير تركيز العقار الثاني الثاليدومايد عند التراكيز (0.25، 0.5، 1، 2) مايكروغرام/مل وفيما بعد ثبت تركيز عقار الثاليدومايد عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب عند التراكيز (1، 2، 3، 4) مايكروغرام/مل.

7.3 تأثير العقارين على نمو، عدد وزمن الجيل ليروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية

Effect of two Drugs on Growth, Generation Number and Time of *L. tropica* and *L. donovani* Promastigotes.

استخدمت ستة تراكيز عند دراسة تأثير عقار الثاليدومايد منفرداً تراوحت بين (10-30) مايكروغرام/مل واستخدمت خمسة تراكيز من عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب منفردة تراوحت ما بين (5 - 30) مايكروغرام/مل، وفي حالة التازير بين العقارين تم استخدام أربعة تراكيز. تم اضافة هذه التراكيز المحضرة كل على انفراد وبواقع 0.1 مل الى القناني الزجاجية سعة 30 مل بعد تحضير الوسط الكامل بالنسب المذكورة سابقاً وتمت مقارنتها مع النموذج الضابط (Control). لقحت الاوساط بعدها بـ 0.1 مل من المزرعة عند الطور اللوغارتمي

بعدد (2 × 10⁵) خلية/ مل وحضنت بدرجة 26 م° لمدة اربعة ايام وقدر معدل النسبة المئوية للنمو واوجد تركيز LD₅₀ وLD₉₀ عند الطور اللوغارتمي (72) ساعة.

وحسب عدد الجيل Generation Number وزمن الجيل Generation Time للنوعي الطفيلي ومقارنتها مع النموذج الضابط (Control) بحسب قانون (Benjamin & German, 1993).

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

اذ تمثل (n) عدد الجيل

(N) عدد الكائنات عند الزمن (t)

(N₀) عدد الخلايا المبدوء بها

$$g = \frac{t}{n} \text{ والقانون:}$$

(g) هي زمن الجيل بالساعات

(t) الفترة الزمنية للتعرض

(n) عدد الجيل

8.3 صبغ الطفيلي Parasite staining

تم صبغ الطور المسوط للشمانيا بصبغة كيمزا حسب طريقة (Mokobi, 2021).

1.8.3 تحضير الصبغة Preparation of Giemsa Stain

1. اذيب (3.8 غم) من بادور كيمزا في 250 مل من الميثانول.
2. سخن لدرجة حرارة 60 م° ليتم الذوبان بصورة جيدة.
3. اضيف الى المزيج 250 مل من الكليسيرين ببطئ ويحرك.
4. رشح المزيج بورق ترشيح لينتج الـ Stock Solution من الصبغة.
5. أخذ 10 مل من الصبغة المحضرة Stock Solution واطفأ الى 80 مل من الماء المقطر و10 مل من الميثانول ثم حفظت في مكان مظلم.

2.8.3 طريقة الصبغ Method of Staining

1. حضرت مسحة خفيفة من الطفيليات على السلايد الزجاجي النظيف، وتركت لتجف.
2. ثبتت المسحة بالـ Methanol لمدة دقيقة واحدة.

3. وضعت الصبغة المحضرة سابقاً لمدة 15 دقيقة.
4. غسلت الشرائح بالماء المقطر او بالمحلول المنظم.
5. جففت الشرائح وفحصت بالمجهر الضوئي.

3.8.3 طريقة تحضير المحلول المنظم Preparation of Buffer Solution

اذيب 700 ملغم من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH_2PO_4 مع 1 غم من فوسفات الصوديوم ثنائي الهيدروجين Na_2HPO_4 في لتر من الماء المقطر وثبت الرقم الهيدروجيني عند درجة 7.2.

9.3 تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب وعقار الثاليدومايد على مورثات بروماستكوت اللشمانيا.

Effect of Liposomal Amphotericin B and Thalidomide on Leishmania Promastigote Genes.

تم اختبار العقارين عند التراكيز المثبطة لـ 50% من البروماستكوت بصورة منفردة او في حالة التآزر على بعض المورثات ومعرفة فيما اذا حدث فيهما تباينات وراثية أم لا، ولإجراء الاختبارات يجب استخلاص الحمض النووي DNA من هذه الطفيليات.

1.9.3 استخلاص الحمض النووي DNA Extraction

تم الاعتماد على المواد المجهزة من شركة (Geneaid) في استخلاص الحمض النووي من العينات التابعة لجنس *Leishmania* وحسب الخطوات الآتية:

1. اخذ 500 مايكروليتر من معلق البروماستكوت المحضر في الفقرة 4.3 من المواد وطرائق العمل وبما يعادل $10^9 \times 1$ خلية واضيف الى انبوبة ابندروف بحجم 1.5 مل.
2. اضيف الى انبوبة الابندروف 200 مايكروليتر من انزيم Lysozyme بتركيز 0.8 ملغم/ 200 مل مع اجراء المزج باستخدام Vortex.
3. حضن الانبوب عند درجة 37 م° لمدة 30 دقيقة وقلب الانبوب كل 3 دقائق في فترة التحضين.
4. اضيف 20 مايكروليتر من Proteinase K ومزج بـ Vortex.
5. حضن المزيج بدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق.
6. اضيف 200 مايكروليتر من المحلول المنظم (CB) Cell lysis Buffer ومزج باستخدام الـ Vortex ثم حضن بدرجة 70 م°.

7. اضيف 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق ومزج يدوياً ثم نقل المزيج الى انبوب GD المثبت في انبوب الجمع واجري له طرد مركزي بقوة 16000g لمدة 30 ثانية، ويتم التخلص من الراشح ثم يضاف 600 مايكروليتر من محلول الغسل Elution Buffer ويعمل طرد مركزي بنفس السرعة والوقت السابق ثم تم التخلص من الراشح واعيد الطرد المركزي لمدة 3 دقائق للتخلص من جميع بقايا محلول الغسل. نقل عمود GD الى أنبوب ابندروف 1.5 مل جديد ويضاف 100 مايكروليتر من محلول الاذابة Solute Solution ثم ترك لمدة 3 دقائق بعد اجراء الطرد المركزي بسرعة 16000g لمدة 30 ثانية وحفظ الـ DNA لحين الاستخدام.

2.9.3 تقدير نقاوة وتركيز DNA

Estimation of Purity and Concentration of DNA

تم الحصول على نقاوة عالية للـ DNA المستخلص من طفيلي اللشمانيا الجلدية والاحشائية باستخدام طريقة عمود الفصل Split Column الموجود في الكتات التي تم استعمالها.

3.9.3 استخلاص الحمض النووي من الهلام DNA Extraction from Gel

تم استخلاص الحزم التي تنتج من تفاعل الـ PCR من الهلام ومن ثم تنقيتها وارسالها لاجراء اختبار تسلسل تتابع النيوكليوتيدات بالاعتماد على المواد المجهزة من قبل شركة (Geneaid) وحسب الخطوات:

1. تم قطع الحزمة من هلام الاكاروز باستخدام مشروط معقم مع ازالة أكبر كمية من الهلام التي تحيط بالحزمة.
2. نقل تقريباً 300 ملغم من قطعة الهلام الى انبوبة ابندروف 1.5 مل واضيف لها 500 مايكروليتر من المحلول المنظم DF ومزجها باستخدام جهاز الفورتكس.
3. حضن الانبوب بدرجة حرارة 55 - 60 °م لمدة 15 دقيقة لضمان كامل لقطعة الهلام مع الحزمة ثم قلب الانبوب كل 3 دقائق في فترة التحضين وترك الانبوب ليبرد بدرجة حرارة الغرفة.
4. نقل 800 مايكروليتر من خليط الصبغة الى عمود DF المثبت في انبوبة الجمع ثم اجراء طرد مركزي بقوة 16000g لمدة 30 ثانية ثم التخلص من الراشح.
5. اعيد تثبيت عمود DF مرة ثانية الى انبوبة الجمع ويضاف 600 مايكروليتر من محلول الغسل Elution Bffer ويترك لمدة دقيقة واحدة.
6. اجراء طرد مركزي بالورقة نفسها 16000g لمدة 30 ثانية ويتخلص من الراشح.
7. تكرار الخطوة رقم (6).
8. اجراء طرد مركزي لمدة 3 دقائق لضمان جفاف عمود DF.
9. تم التخلص من انبوب الجمع ونقل محتويات عمود DF الى انبوب جديد 1.5 مل.

10. اضيف 20 – 50 مايكروليتر من محلول الاذابة (Elution Buffer) الى وسط العمود.

11. ترك لمدة دقيقتين لضمان امتصاص محلول الاذابة.

12. اجراء طرد مركزي لمدة دقيقتين 16000g للحصول على الـ DNA المذاب.

4.9.3 تحضير هلام الاكاروز وعملية الترحيل الكهربائي لـ DNA

Preparation of Agarose Gel and Electrophoresis

لترحيل الـ DNA والكشف عنه حضر هلام الاكاروز بتركيز 1% وللحصول على هذا التركيز تم اذابة 0.5 غم من مسحوق الاكاروز في 50 مل من TBE (1X) ثم اضيف 3 مايكروليتر من صبغة Red Safe DNA تم ذلك باستخدام مصدر حراري مع التحريك المستمر لحين الغليان وترك ليبرد الى درجة حرارة (50 – 60) م°.

صب محلول الهلام في الحوض الخاص Tray بجهاز الترحيل بعد أن ثبت المشط الخاص لتكوين الحفر Wells عند اطراف الهلام مع مراعاة الصب بهدوء لتجنب تكوين الفقاعات، وأن تكونت يتم ازالتها باستخدام الماصة، ثم ترك الهلام حتى يتصلب.

بعدها وضع الـ Tray في حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على كمية مناسبة من محلول TBE (1X) بعدها رفع المشط بهدوء.

حضرت عينات الترحيل بمزج 5 مايكروليتر من عينة الـ DNA مع 3 مايكروليتر من محلول التحميل ويتم بعد ذلك تشغيل جهاز الترحيل بامرار التيار الكهربائي بفرق جهد 5 فولط/سم واستغرقت العملية 1.5-2 ساعة. ثم تم تصوير الهلام تحت الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز تصوير الهلام Gel documentation للتمكن من رؤية حزم الـ DNA وايضاً ناتج تفاعل الـ PCR.

5.9.3 تفاعلات الـ PCR Reaction

تم ضبط تركيز الـ DNA في كافة العينات الدراسية بالتخفيف بوساطة محلول TE للحصول على التركيز المطلوب لاجراء تفاعلات الـ PCR وبواقع 50 نانوغرام/ مايكروليتر لكل عينة. اذ تم تحضير خليط التفاعل الرئيس Master Reaction لكل تفاعل PCR بمزج عينة الـ DNA والبادئ الخاص لكل مورث مع مكونات Master mix داخل انبوبة الابندروف سعة 0.2 مل والمجهز من شركة Biolabs الانكليزية ثم ثبت حجم التفاعل عند 20 مايكروليتر بالماء المقطر. ثم نبذ المزيج في جهاز Microfuge 2ⁿ لفترة مابين (3 – 5) ثواني للتأكد من مزج مكونات التفاعل، ثم ادخلت انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لاجراء التفاعل التضاعفي باستخدام البرنامج الخاص لكل تفاعل. بعدها تم تحميل العينة في حفر هلام الاكاروز المحضر مسبقاً بتركيز 2% مع اضافة الدليل الحجمي Ladder DNA المجهز من شركة Biolabs في احدى الحفر، ويتم

بعد ذلك ترحيل العينات بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة تتراوح بين (60 - 70) دقيقة من ثم يتم تصوير الهلام باستخدام جهاز الـ Gel documentation.

6.9.3 التشخيص الجزيئي لطيفلي الشمانيا بالاعتماد على منطقة 18rDNA لمورث *KMP II*

تم الكشف عن وجود المنطقة المضخمة وذلك باضافة 4 مايكروليتر (100 نانوغرام) من الـ DNA القالب و 1 مايكروليتر (10 بيكومول) من البادئ الخاص بالجين الى محتويات الـ Master mix لـ 5 نماذج من *L. tropica* وشملت نموذج السيطرة و IC_{50} الامفوترسين اللايوسومي ب والتاليدومايد ونموذجي التازر الأول بتثبيت الامفوترسين على 2.5 مايكروغرام/ مل والثاني بتثبيت التاليدومايد على 2.5 مايكروغرام/ مل ونموذج الـ *L. donovani* ايضاً الذي يشمل نموذج السيطرة و IC_{50} للامفوترسين والتاليدومايد ونموذجي التازر بتثبيت الامفوترسين على 2.5 مايكروليتر والآخر تثبيت التاليدومايد على 2.5 مايكروغرام لعشر نماذج مع نماذج للسيطرة للنوعين كليهما من الطفيلي، وقد تم استخدام البادئ بحسب التسلسلات والمجهز من شركة Geneaid. بحسب التسلسلات للقواعد النترجينية الماخوذة من المصدر في ادناه.

الجدول (4) تسلسل القواعد النتروجينية لمورث *KMP11*

البرايمرات	السلاسل
<i>KMP11 – F</i>	AAGCTTATGGCCACCACGTACGAGGAG
<i>KMP11 – R</i>	GAATTCTTACTTGGATGGGTACTFCGCAGC

(Soflaei et al., 2013) وتم بعدها ادخال انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لاجراء تفاعل التضخيم وباستخدام البرنامج الخاص للتفاعل وكما موضح في الجدول (5)

الجدول (5) برنامج الـ PCR الخاص بتضخيم مورث *KMP11*

ت	الخطوات	درجة الحرارة °م	الوقت/ دقيقة	عدد الدورات
1	المسخ الأولي لشريط الـ DNA	94	2.00	1
2	مسح الشريط المزدوج	94	0.30	35
3	ارتباط البادئ بالـ DNA القالب	59	0.30	35
4	الاستطالة	72	0.30	35
5	الاستطالة النهائية استكمال الاستطالة	72	7.00	1

7.9.3 التشخيص الجزيئي لطفيلي الشمانيا بالاعتماد على منطقة 18rDNA لمورث *NDI*

تم الكشف عن وجود المنطقة المضخمة لجين الـ *NDI* باضافة 4 مايكروليتر (100 نانوغرام) من الـ DNA القالب و 1 مايكروليتر (10 بيكومول) من البادئ الخاص بالمورث الى محتويات الـ Master mix لـ 5 نماذج من *L. tropica* وشملت نموذج السيطرة و IC_{50} الامفوترسين الالايوسومي ب والثاليدومايد ونموذجي التازر الأول بتثبيت الامفوترسين على 2.5 مايكروغرام/مل والثاني بتثبيت الثاليدومايد على 2.5 مايكروغرام/مل ونموذج الـ *L. donovani* ايضاً يشمل نموذج السيطرة IC_{50} الامفوترسين والثاليدومايد ونموذجي التازر بتثبيت الامفوترسين على 2.5 مايكروليتر والآخر تثبيت الثاليدومايد على 2.5 مايكروغرام لعشر نماذج مع نماذج للسيطرة للنوعين كليهما من الطفيلي وقد تم استخدام البادئ الخاص بالمورث وحسب التسلسلات الاتية والمجهز من شركة Geneaid. بحسب التسلسلات للقواعد النتروجينية الماخوذة من المصدر (Yatawara *et al.*, 2008).

الجدول (6) تسلسل القواعد النتروجينية لمورث *NDI*

البراميرات	السلاسل
<i>NDI</i> – F	AGCCCCCAAACAGAGACTG
<i>NDI</i> – R	CGCTGGGTTGATTACAGAACTATC

تم بعدها ادخال انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لاجراء التفاعل التضاعفي باستخدام البرنامج الخاص للتفاعل وكما يتضح في الجدول (7)

الجدول (7) برنامج الـ PCR الخاص بتضخيم مورث *NDI*

ت	الخطوات	درجة الحرارة م°	الوقت/ دقيقة	عدد الدورات
1	المسخ الأولي لشريط الـ DNA	94	0.30	1
2	مسح الشريط المزدوج	94	0.30	35
3	ارتباط البادئ بالـ DNA القالب	57	0.30	35
4	الاستطالة	68	5	35
5	الاستطالة النهائية استكمال الاستطالة	72	7	1

8.9.3 التشخيص الجزيئي لطفي الشمانيا بالاعتماد على منطقة 18rDNA للسلسلة الداخلية المستنسخة ITS1-IS

تم الكشف عن وجود الحزمة المضخمة لسلسلة الـ ITS1 بإضافة 4 مايكروليتر (100 نانوغرام) من الحمض النووي القالب و 1 مايكروليتر (10 بيكومول) من البادئ الخاص بالمورث الى محتويات الـ Master mix لـ 5 نماذج من *L. tropica* وشملت نموذج السيطرة و IC₅₀ الامفوترسين الـ لايبوسومي ب والثاليدومايد ونموذجي التازر الأول ببتثيت الامفوترسين على 2.5 مايكروغرام/مل والثاني ببتثيت الثاليدومايد على 2.5 مايكروغرام/مل وكذلك نموذج الـ *L. donovani* ايضاً يشمل نموذج السيطرة IC₅₀ الامفوترسين والثاليدومايد ونموذجي التازر ببتثيت الامفوترسين على 2.5 مايكروليتر والآخر تثبيت الثاليدومايد على 2.5 مايكروغرام لعشر نماذج مع نماذج للسيطرة للنوعين كليهما من الطفيلي وقد تم استخدام البادئ الخاص بالسلسلة والمجهز من شركة Geneaid. بحسب التسلسلات للقواعد النتروجينية الماخوذة من المصدر (Oshaghi et al., 2013).

الجدول (8) تسلسل القواعد النتروجينية لسلسلة ITS1

البراميرات	السلاسل
ITS1-F /LITSR	CTGGATCATTTCCTCGATG
ITS1-R /L5.8S	TGATACCACTTATCGCACTT

بعدها تم ادخال انابيب التفاعل في جهاز المبلر الحراري Thermo cycler لاجراء التفاعل التضاعفي وباستخدام البرنامج الخاص للتفاعل وكما موضح في الجدول (9).

الجدول (9) برنامج الـ PCR الخاص بتضخيم السلسلة الداخلية المستنسخة ITS1

ت	الخطوات	درجة الحرارة °م	الوقت/ دقيقة	عدد الدورات
1	المسخ الأولي لشريط الـ DNA	95	5.00	1
2	مسح الشريط المزدوج	94	0.30	35
3	ارتباط البادئ بالـ DNA القالب	54	0.45	35
4	الاستطالة	72	1	35
5	الاستطالة النهائية استكمال الاستطالة	72	5	1

9.9.3 تحديد تتابع النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية DNA Sequencing

حدد تسلسل القواعد النتروجينية لعينات طفيلي الشمانيا المعاملة بالادوية بنوعيتها قيد الدراسة وقد ارسلت نتائج تفاعل الـ PCR للعينات مع البودئ الخاصة بالحزمة الناتجة وتمت قراءة التسلسل للمورثات بالاعتماد على Genetic Analyzer المجهز من شركة Hitachi اليابانية. تم مطابقة التسلسلات الخاصة بالمورثات مع تسلسلات المورثات الموثقة في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية NCBI وحلت النتائج بالاعتماد على برنامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool.

10.3 تحديد سمية LD₅₀ داخل الجسم الحي

In Vivo determination of lethal dose (LD₅₀)

تم تحديد الجرعة المميتة (LD₅₀) لعقار الثاليدومايد في الجرذان البيضاء البالغة باستخدام طريقة الصعود والنزول بالتجريع في الفم واستخدمت في هذه التجربة ثمان ذكور جرذان بالغة تراوحت اوزانها بين 220 – 250 غم واعمارها 10 – 12 اسبوعاً وتم تحديد الجرعة الأولية لعقار الثاليدومايد بمقدار 2500 ملغم/ كغم من وزن الجسم بالاعتماد على تجارب أولية ومن ثم قراءة النتيجة (هلاك الحيوان او بقاءه حياً) بعد مرور 24 ساعة من التجريع وكان مقدار الزيادة والنقصان في الجرعة مقدراً ثابتاً وهو 500 ملغم/ كغم من وزن الجسم وتكرر هذه العملية مع التغير في مقدار الجرعة لحين ظهور التغير في النتيجة (بقاء الحيوان حياً او هلاكه) وبعد ظهور أول تغير تم تجريع ثلاث حيوانات بشكل منفرد مع مراعاة التغير في الجرعة بالصعود او النزول واعتماداً على الجدول الذي ذكره (Dixon, 1980) إذ يمكن حساب LD₅₀ في القانون الآتي:

$$LD_{50} = Xf + Kd$$

LD₅₀: الجرعة المميتة الوسيطة

Xf: اخر جرعة استخدمت في التجربة

K: القيمة الجدولية (0.741)

d: مقدار الزيادة والنقصان الثابت في التجربة

تم تحديد الجرعة المميتة (LD₅₀) لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في الجرذان البيضاء البالغة باستخدام طريقة الصعود والنزول بالحقن بالخلب واستخدمت في هذه التجربة عشرة ذكور جرذان بالغة تراوحت اوزانهم 220-250 غم واعمارهم 10-12 أسبوعاً، وقد تم تحديد الجرعة الأولية

لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب بمقدار 1500 ملغم/ كغم من وزن الجسم وبالاتماد على تجارب أولية ومن ثم قراءة النتيجة بعد 24 ساعة (هلاك الحيوان او بقاءه حيا) وقد كان مقدار الزيادة والنقصان بالجرعة ثابتا وهو (500) ملغم/ كغم من وزن الجسم، وتم تكرار هذه العملية مع التغير في الجرعة لحين ملاحظة اول تغير ظهر على الحيوان (هلاكه او بقاءه حيا) وبعدها تم اخذ ثلاث حيوانات بشكل منفرد مع مراعاة التغير في الجرعة صعودا ونزولا واعتمادا (Dixon, 1980).

بحسب القانون الذي تم ذكره فيمكن حساب LD_{50}

$$LD_{50} = Xf + Kd$$

11.3 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم استخدام برنامج الـ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) النسخة (21) في عملية التحليل الاحصائي للنتائج التي تم الحصول عليها باستخدام التصميم العشوائي الكامل واختبار دنكن متعدد المدى Duncan's Multiple Range Test عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في تجارب النمو وتحديد عدد الجيل لنوعي اللشمانيا المعاملة وغير المعاملة وزمنهما (Moore and Lock-Wood, 2010).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4 تحديد الطور اللوغارتمي Log Phase Determination

تم تحديد الطور اللوغارتمي لبروماستكوت (Promstigote) طفيلي الشمانيا النامية في وسط Tobie's الثنائي الطور والمضاف له دم الانسان بنسبة 15% الذي لقح بالشمانيا بـ (2×10^5) خلية/مل وحضنت بدرجة 26 م° وقد تم احتساب عدد الطفيليات يومياً بوساطة الهيموسايتوميتر Haemocytometer ولمدة خمسة أيام كما يتضح في الجدول رقم (10) والشكل (17) و(18).

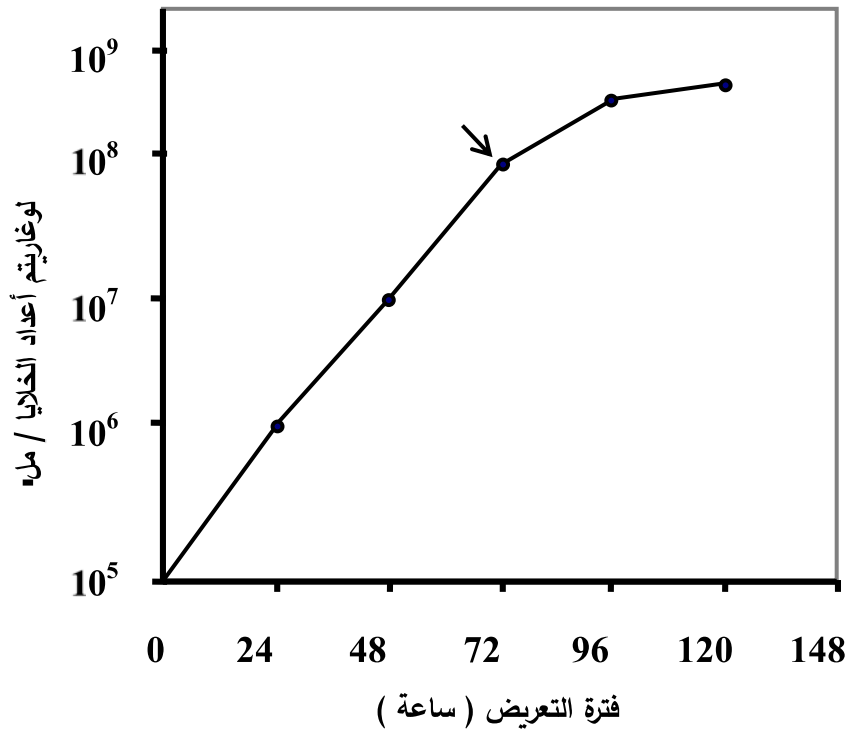
جدول (10) عدد بروماستكوت ($10^6 \times n$) لطفيلي الشمانيا الجلدية والشمانيا الاحشائية ولفترات زمنية مختلفة عدد البروماستكوت المبدوء به (2×10^5).

<i>L. donovani</i>	<i>L. tropica</i>	عدد البروماستكوت خلية /مل الفترة الزمنية (ساعة)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.04 ± 2.26	0.07 ± 1.800	24
0.19 ± 33.66	0.40 ± 32.46	48
0.92 ± 67.06	0.41 ± 64.23	72
2.44 ± 84.61	0.64 ± 81.96	96
0.18 ± 46.65	0.14 ± 43.36	120

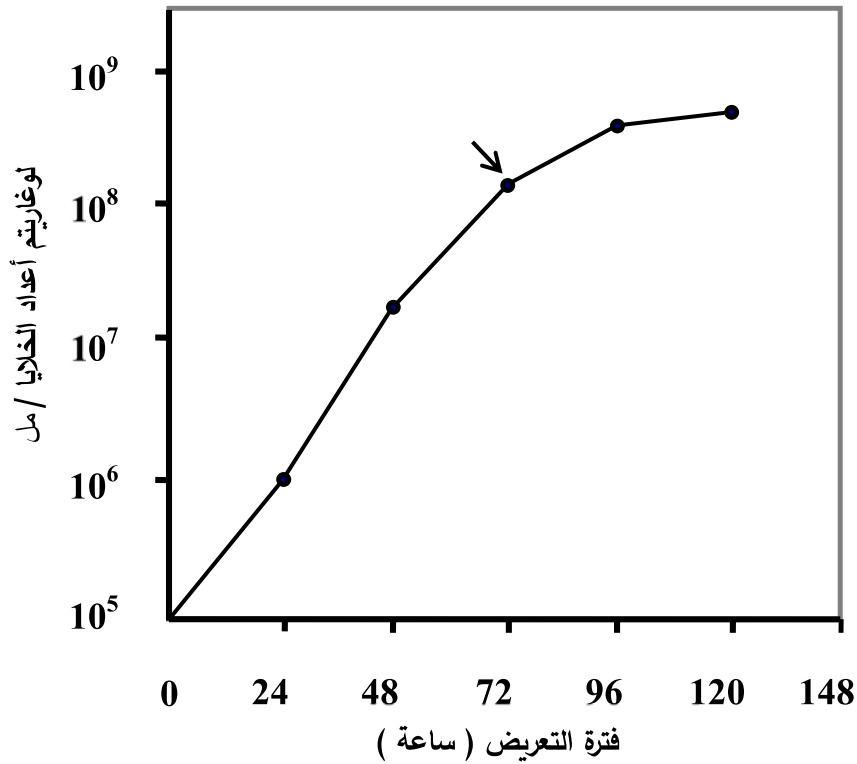
* كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات

** مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

نلاحظ أن عدد البروماستكوت يبدأ بالزيادة الخطية بعد مرور (24، 48، 72) ساعة، ثم بعد مرور (96) ساعة هناك زيادة محدودة وعند (120) ساعة تنعدم الزيادة في عدد الطفيليات. ومن خلال متابعة النمو لمدة خمسة ايام يتبين لنا أن فترة الـ (72) ساعة تعد الطور اللوغارتمي لبروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية. وان عدد بروماستكوت الشمانيا الجلدية *L. tropica* عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة 64.23 خلية/مل ولبروماستكوت الشمانيا الاحشائية 67.06 خلية/مل.



الشكل (17): منحنى نمو بروماستكوت اللشمانيا الجلدية
L. tropica لتحديد الطور اللوغارتمي



الشكل (18): منحنى نمو بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية
L. donovani لتحديد الطور اللوغارتمي

2.4 تأثير عقار الثاليدومايد في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية

Effect of thalidomide treatment on growth, generation number and generation time of *L. tropica*

يظهر الجدول (11) تأثير عقار الثاليدومايد بتركيز مختلف تتراوح بين (10 - 30) مايكروغرام/مل على نمو عدد بروماستكوت اللشمانيا الجلدية مقارنة مع اللشمانيا غير المعاملة Control و يتبين في الجدول التأثير المثبط وأن هناك علاقة عكسية بين معدل النمو لبروماستكوت الطفيلي مع زيادة تركيز العقار اذ كلما زاد التركيز قلت اعداد الطفيلي وزدادت النسبة المئوية للتثبيط. وقد تراوحت نسبة التثبيط للعقار عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة ما بين (50-92)% للتركيز من 10-30 مايكروغرام/مل ويظهر الجدول ان التركيز الذي يعمل على قتل 50% من البروماستيكوت IC_{50} هو 10 مايكروغرام/مل عند الطور اللوغارتمي من النمو وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند $p \leq 0.05$ في الطفيليات المعاملة وغير المعاملة بعقار الثاليدومايد ضمن فترة التعريض (24، 48، 72، 96) ساعة مقارنة مع نموذج السيطرة.

ويبين الجدول (12) التأثير التثبيطي للعقار على عدد الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية اذ لحظ انه مع زيادة تركيز العقار يقل عدد الجيل لطفيلي اللشمانيا الجلدية بازدياد فترة التعريض مقارنة مع مجموعة السيطرة.

وقد لحظ أن عدد الجيل كان 7.01 جيل عند تركيز 10 مايكروغرام/مل ليصل الى 4.62 جيل عند تركيز 30 مايكروغرام/مل مقارنة مع مجموعة السيطرة 8.04 جيل بوجود عقار الثاليدومايد عند الطور اللوغارتمي واطهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

ويبين الجدول (13) تأثير عقار الثاليدومايد على زمن الجيل وقد كانت العلاقة طردية فكلما زاد تركيز العقار زاد زمن الجيل اذ يتراوح زمن الجيل ما بين 10.27 ساعة عند تركيز 10 مايكروغرام/مل الى 15.57 ساعة عند تركيز 30 مايكروغرام/مل مقارنة مع السيطرة 8.96 ساعة وعند الطور اللوغارتمي 72 ساعة وقد اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في زمن الجيل للطفيلي عند الفترات (24، 48، 72، 96) ساعة.

جدول (11) تأثير عقار الثاليدومايد في نمو بروماستوكوت طفيلي اللشمانيا الجلدية *L. tropica* (خلية 10×6)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل) Control
% تنشيط	% المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تنشيط	% المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تنشيط	% المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تنشيط	% المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
--	0.55 ± 45.50^a	--	1.28 ± 53.60^a	--	0.32 ± 26.56^a	--	0.01 ± 1.15^a	Control
51	0.60 ± 22.20^b	50	2.80 ± 26.73^b	47	0.49 ± 13.90^b	46	0.00 ± 0.62^b	10
56	0.64 ± 19.70^c	62	0.44 ± 20.16^c	52	0.49 ± 12.73^b	52	0.01 ± 0.55^c	12.5
72	0.20 ± 12.50^d	73	0.20 ± 14.46^d	63	0.53 ± 9.76^c	57	0.01 ± 0.49^d	15
77	0.55 ± 10.20^e	77	0.20 ± 12.30^d	71	0.50 ± 7.56^d	63	0.03 ± 0.42^e	20
90	0.36 ± 4.16^f	89	0.20 ± 5.85^e	83	0.12 ± 4.26^e	73	0.01 ± 0.31^f	25
92	0.08 ± 3.23^g	92	0.12 ± 5.03^e	87	0.05 ± 3.20^e	88	0.00 ± 0.13^g	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاث مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (12) تأثير عقار الثاليدومايد في عدد الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية

L. tropica

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.01 $\pm$ 7.80 ^a	0.02 $\pm$ 8.04 ^a	0.01 $\pm$ 7.02 ^a	0.02 $\pm$ 2.48 ^a	Control
0.03 $\pm$ 6.76 ^b	0.15 $\pm$ 7.01 ^b	0.05 $\pm$ 6.08 ^b	0.01 $\pm$ 1.60 ^b	10
0.07 $\pm$ 6.64 ^b	0.03 $\pm$ 6.62 ^c	0.05 $\pm$ 5.96 ^b	0.03 $\pm$ 1.44 ^{bc}	12.5
0.02 $\pm$ 5.93 ^c	0.02 $\pm$ 6.14 ^d	0.08 $\pm$ 5.57 ^c	0.03 $\pm$ 1.27 ^c	15
0.07 $\pm$ 5.64 ^d	0.02 $\pm$ 5.91 ^e	0.09 $\pm$ 5.19 ^d	0.13 $\pm$ 1.05 ^d	20
0.11 $\pm$ 4.35 ^e	0.05 $\pm$ 4.84 ^f	0.03 $\pm$ 4.38 ^e	0.02 $\pm$ 0.61 ^e	25
0.04 $\pm$ 3.98 ^f	0.03 $\pm$ 4.62 ^g	0.02 $\pm$ 3.96 ^f	0.01 $\pm$ 0.52 ^f	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب

اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (13) يوضح تأثير عقار الثاليدومايد في زمن الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية *L.*

tropica

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.02 $\pm$ 12.30 ^f	0.04 $\pm$ 8.96 ^g	0.01 $\pm$ 6.83 ^f	0.09 $\pm$ 9.60 ^d	Control
0.08 $\pm$ 14.20 ^e	0.21 $\pm$ 10.27 ^f	0.06 $\pm$ 7.88 ^e	0.12 $\pm$ 14.98 ^{bc}	10
0.16 $\pm$ 14.45 ^e	0.05 $\pm$ 10.86 ^e	0.06 $\pm$ 8.05	0.36 $\pm$ 16.67 ^{bc}	12.5
0.06 $\pm$ 16.17 ^d	0.03 $\pm$ 11.71 ^d	0.12 $\pm$ 8.61 ^d	0.56 $\pm$ 18.87 ^{bc}	15
0.23 $\pm$ 17.03 ^c	0.05 $\pm$ 12.17 ^c	0.16 $\pm$ 9.25 ^c	3.55 $\pm$ 23.78 ^b	20
0.57 $\pm$ 22.08 ^b	0.15 $\pm$ 14.88 ^b	0.10 $\pm$ 10.94 ^b	6.09 $\pm$ 40.80 ^a	25
0.23 $\pm$ 24.10 ^a	0.12 $\pm$ 15.57 ^a	0.07 $\pm$ 12.09 ^a	2.86 $\pm$ 49.06 ^a	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاث مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب

اختبار دنكن احادي الاتجاه

3.4 تأثير عقار الثاليدومايد في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية

Effect of thalidomide treatment on growth, generation number and generation time of *L. donovani*

يبين الجدول (14) تأثير عقار الثاليدومايد بتركيز مختلفة تراوحت ما بين (10 - 30) مايكروغرام/مل على نمو عدد بروماستكوت اللشمانيا الاحشائية *L. donovani* مقارنة مع اللشمانيا غير المعاملة (السيطرة). ويتبين في الجدول التأثير السمي لعقار الثاليدومايد وأن هناك علاقة عكسية بين معدل النمو لبروماستكوت الطفيلي مع زيادة تركيز العقار اذ كلما ازداد تركيز العقار قلت اعداد الطفيلي وزدادت النسبة المئوية للتثبيط. وقد تراوحت نسبة التثبيط المئوية للعقار عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة ما بين (20 - 91)% وللتراكيز من 12.5 - 30 مايكروغرام/مل ويظهر الجدول ان التركيز الذي يقتل 50% من البروماستكوت IC₅₀ هو 12.5 مايكروغرام/مل عند الطور اللوغارتمي من النمو.

وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في الطفيليات المعاملة وغير المعاملة بعقار الثاليدومايد ضمن فترة التعريض (24، 48، 72، 96) ساعة مقارنة مع نموذج السيطرة.

يبين الجدول (15) التأثير التثبيطي للعقار على عدد الجيل فقد لاحظ انه مع ازدياد التركيز للعقار يقل عدد الجيل لطفيلي اللشمانيا الاحشائية وبازدياد فترة التعريض مقارنة مع مجموعة (السيطرة) بعلاقة عكسية وقد لاحظ ان عدد الجيل كان 7.46 جيل عند تركيز 10 مايكروغرام/مل و4.25 جيل عند تركيز 30 مايكروغرام/مل مقارنة مع مجموعة السيطرة 7.83 جيل بالنسبة لعقار الثاليدومايد.

واظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في اعداد الجيل لطفيلي اللشمانيا الاحشائية مقارنة مع نموذج السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

ويبين الجدول (16) تأثير عقار الثاليدومايد على زمن الجيل بعلاقة طردية فكلما زاد تركيز العقار زاد زمن الجيل اذ تراوح زمن الجيل ما بين 9.65 ساعة عند تركيز 10 مايكروغرام/مل الى 16.94 ساعة عند تركيز 30 مايكروغرام/مل مقارنة مع نموذج السيطرة 9.19 ساعة عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة. إذ اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 $p \leq$ في زمن الجيل لطفيلي اللشمانيا الاحشائية مقارنة مع السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

جدول (14) تأثير عقار الثاليدومايد في نمو بروسامستكوت اللشمانيا الاحشائية *L. donovani* (خلية $\times 10^6$)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل) Control
% تنشيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تنشيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تنشيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تنشيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
--	0.52 ± 33.20^a	--	0.95 ± 46.50^a	--	0.31 ± 22.93^a	--	0.02 ± 1.13^a	Control
11	0.68 ± 29.50^b	20	0.51 ± 37.10^b	28	0.81 ± 16.50^b	44	0.03 ± 0.63^b	10
49	0.57 ± 16.76^c	50	0.49 ± 22.93^c	51	0.60 ± 11.20^c	53	0.00 ± 0.53^c	12.5
64	0.60 ± 11.80^d	61	0.51 ± 17.83^d	61	0.38 ± 8.73^d	61	0.01 ± 0.43^d	15
72	0.55 ± 9.20^e	67	0.25 ± 15.00^e	80	0.48 ± 4.53^e	73	0.01 ± 0.30^e	20
80	0.25 ± 6.50^f	83	0.63 ± 7.66^f	84	0.17 ± 3.50^e	77	0.02 ± 0.25^e	25
89	0.17 ± 3.50^g	91	0.35 ± 3.93^g	86	$0.053.10 \pm ^e$	87	0.02 ± 0.14^f	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول رقم (15) تأثير عقار الثاليدومايد في عدد الجيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية *L. donovani*

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.02 ± 7.34^a	0.03 ± 7.83^a	0.02 ± 6.81^a	0.02 ± 2.47^a	Control
0.03 ± 7.17^a	0.06 ± 7.46^b	0.07 ± 6.33^b	0.07 ± 1.62^b	10
0.05 ± 6.35^b	0.02 ± 6.81^c	0.07 ± 5.77^c	0.01 ± 1.39^c	12.5
0.07 ± 5.85^c	0.04 ± 6.44^d	0.01 ± 5.37^d	0.03 ± 1.08^d	15
0.08 ± 5.49^d	0.02 ± 6.20^e	0.14 ± 4.46^e	0.08 ± 0.58^e	20
0.05 ± 4.99^e	0.12 ± 5.22^f	0.72 ± 4.09^f	0.03 ± 0.40^f	25
0.04 ± 4.19^f	0.12 ± 4.25^g	0.10 ± 4.00^f	0.01 ± 0.35^g	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاث مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول رقم (16) تأثير عقار الثاليدومايد في زمن الجيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية *L. donovani*

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.04 ± 13.07^f	0.03 ± 9.19^e	0.02 ± 7.04^e	0.10 ± 9.69^f	Control
0.04 ± 13.48^f	0.08 ± 9.65^e	0.08 ± 7.58^e	0.66 ± 14.86^{de}	10
0.11 ± 15.10^e	0.04 ± 10.57^d	0.11 ± 8.31^d	0.21 ± 17.22^{de}	12.5
0.20 ± 16.42^d	0.07 ± 11.17^c	0.02 ± 8.93^c	0.85 ± 22.20^{de}	15
0.27 ± 17.49^c	0.04 ± 11.61^c	0.34 ± 10.79^b	5.80 ± 42.88^c	20
0.21 ± 19.25^b	0.32 ± 13.80^b	0.20 ± 11.72^a	4.69 ± 60.56^b	25
0.25 ± 22.91^a	0.50 ± 16.94^a	0.31 ± 11.99^a	3.20 ± 65.00^a	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاث مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

تظهر هذه الدراسة التأثير الفعال لعقار الثاليدومايد في تثبيط نمو 90% من بروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية عند تركيزي (25 و 30) مايكروغرام/ مل وتثبيط 50% عند تركيزي (10 و 12.5) مايكروغرام/ مل للنوعين كليهما من البروماستكوت على التوالي. ووجد في البحوث أن الية عمل الثاليدومايد والادوية المعدلة للمناعة immunomodulatory drugs (IMiDS) التي تمنع عديد من المسارات المهمة لتطور المرض بالنسبة لمرضى السرطان والاورام. فيُعد الثاليدومايد عاملاً ذا خصائص مضادة لتولد الاوعية الدموية المغذية للورم ويمنع انتاج عامل النمو وتكاثر الخلايا. ويمنع انتاج الانترلوكين X-IL وله دور في تنشيط مسارات موت الخلايا المبرمج (Anderson, 2005). والثاليدومايد مسؤول عن عامل (TNF - alpha) المثبط لانتاج الانترلوكين (IL) والمسؤول عن نمو 50% من الخلية والمسبب للموت المبرمج ومسبب لقلة نمو اعداد البروماستكوت ويعد الثاليدومايد مثبط لـ Cereblon gene (CRBN) الذي يحتوي على بروتين E3 ligas والموجود في القوارض والانسان ويرتبط عملها بالبروتين الموجود بالغشاء الذي ينقل الكالسيوم مما يُعد هدفاً علاجياً مهماً (Ito et al., 2010).

مما اتفق مع ما جاء به (Al-Healy and Al-Chalabi, 2002) اذ اثبتا ان عقار الكلوروبرومازين Chlorpromazine يستعمل كمضاد للشمانيا بنوعيه *L. major* و *L. donovani* فيقتل 90% من البروماستكوت عند تركيزي (20 و 25) مايكروغرام/ مل بالطور اللوغارتمي خارج الجسم الحي. وقد استخدم باحثون آخرون سلفات الزنك Zinc sulphate لملاحظة تأثيره على *L. major* و *L. tropica* اذ لوحظ ان الاعداد كانت كبيرة في نموذج السيطرة ولكن من خلال التجارب وجد انخفاض في معدل النمو للحصول على معدل تثبيط 50% وعند الطور اللوغارتمي (Bafaghi et al., 2014). وقد اشير الى تأثير الدايفلين Dyphylin المعزول من بعض النباتات مثل *Haplophy lumbuchancum* المعروف بفعاليته ضد الفايروسات والسرطان الذي يعمل ايضاً كمثبط لبروماستكوت *L. infantum* اذ اثبت ان نسبة تثبيط IC₅₀ هي 14.4 ملي مول وانه يثبط الطور غير المسوط amastigote داخل الخلايا عند 0.2 ملي مول وان ميكانيكية عمل Dyphylin هي التغلغل داخل الدورة الخلوية ويدخل في عملية تمثيل البروتين ويزيد من تراكم الدهون الداخلية ولا يزيد من انتاج اوكسيد النتريك NO (Gervazoni et al., 2020). اما (Al-Hamairy, 2016) فقد أشار الى ان التأثير المثبط لـ 50% من Lipopolysaccharide المستخلص من بكتريا *E. coli* على بروماستكوت *L. tropica* خارج الجسم الحي عند التراكيز 25 و 250 مايكروغرام/ مل والتاثير المثبط لـ 78% و 85% عند تركيزي 75 و 500 مايكروغرام/ مل فضلا عن نقصان عدد الجيل بزيادة التركيز وازدياد زمن الجيل، وتتفق هذه الدراسة مع وجهة نظر (Al-Hayali et al., 2018) اذ اكدوا أن لمركبات او مشتقات الـ Pyrrolidines تأثير تثبيطي

وبتراكيز مختلفة على معدل نمو وعدد الزمن الجيل لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية *L. infantum* اذ تم تثبيط 50% من الطفيليات عند تركيز 10 مايكروغرام/ مل عند الطور اللوغارتمي وقلة عدد الجيل مع زيادة التراكيز فضلا عن زيادة زمن الجيل مقارنة مع نموذج السيطرة. وقد أكد بعض الباحثين استخدام الثاليدومايد بنجاح في علاج الآفات الجلدية من مرض الجذام ENL وهو معدل للاستجابة المناعية بنسبة تثبيط 90% لآفة في اسبوعين ومضاد للالتهاب ومضاد لتكوين الاوعية الدموية.

هو مثبط لعامل نمو الورم $\square$ (TNF) عن طريق تعزيز تحلل الحمض الرايبوزي النووي المرسل لعامل نمو الورم mRNA وعامل انترفيرون، γ -interferon (IFN- λ) اذ يعمل على تقليل الخلايا المساعدة T-helper ويزيد من عدد الـ T-suppressor (Hassan et al., 2015). وأشار آخرون الى تسبب الثاليدومايد سواء في الجسم الحي ام في المختبر الى ارتباط بعض Th2 في الإستجابة للتعبير عن جينات التئام الجروح وعوامل النمو التي تدخل في اصلاح الجلد وتجديد الأنسجة (Domingo et al., 2021)

وجد بعض الباحثين نتائج إيجابية لبعض المرضى الذين عولجوا بالثاليدومايد إذ كانوا يعانون من مضاعفات تنفسية حادة وفي ضوء ذلك استخدم الثاليدومايد حلاً مؤقتاً وسريع للمرضى الذين يعانون من COVID-19 وللتخفيف من حدة المرض (Khalil et al., 2020) وقد أشار آخرون الى استعمال عقار الثاليدومايد بوصفه معدلاً مناعياً للتقليل من التهابات داء المبيضات المنتشر المزمن (Cronic disseminated candidiasis (CDC) وهو مرض فطري نادر وصعب الشفاء منه (Rammaert et al., 2017)

4.4 تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الجلدية

Effect of Liposomal amphotericin B treatment on growth, generation number and generation time of *L. tropica*

يبين الجدول (17) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب بتراكيز مختلفة تراوحت ما بين (5 - 30) مايكروغرام/ مل على نمو بروماستكوت الشمانيا الجلدية *L. tropica* مقارنة مع نموذج السيطرة Control اذ يتبين التأثير السمي للعقار على نمو البروماستكوت فنلاحظ وجود علاقة عكسية بين معدل نمو لبروماستكوت الطفيلي مع زيادة تركيز العقار فكلما زاد التركيز قلت اعداد الطفيلي

وزادت النسبة المئوية للتثبيط وقد تراوحت نسبة التثبيط المئوية للعقار ما بين (49 - 98)% في الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

وقد كانت نسبة التثبيط IC_{50} أي 50% من التثبيط لاعداد الطفيلي عند تركيز 5 مايكروغرام/ مل في حين IC_{90} أي 90% عند تركيز 20 مايكروغرام/ مل عند الطور اللوغارتمي مقارنة مع الشمانيا غير المعاملة.

وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في الطفيليات المعاملة بعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب ضمن فترة التعريض مقارنة مع نموذج السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

بين الجدول (18) التأثير التثبيطي لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب على عدد الجيل لبروماستكوت الشمانيا الجلدية *L. tropica* فقد لاحظ انه مع زيادة تركيز العقار هناك تناقص في عدد الجيل لبروماستكوت طفيلي الشمانيا الجلدية وبازدياد فترة التعريض مقارنة مع مجموعة السيطرة اذ هناك علاقة عكسية بين تركيز العقار وبين عدد الجيل عند الطور اللوغارتمي للنمو 72 ساعة. وان عدد الجيل 6.77 جيل عند تركيز 5 مايكروغرام/ مل وقد قل تدريجياً بزيادة التركيز للعقار ليصل الى 2.29 جيل عند تركيز 30 مايكروغرام/ مل مقارنة مع مجموعة السيطرة 7.75 جيل عند الطور اللوغارتمي.

اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في اعداد الجيل لطفيلي الشمانيا الجلدي بعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب مقارنة مع نموذج السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

بين الجدول (19) أن العلاقة طردية بين التركيز وزمن الجيل فكلما زاد التركيز زاد زمن الجيل اذ تراوح زمن الجيل ما بين 10.62 ساعة عند تركيز 5 مايكروغرام/ مل الى 34.69 ساعة عند تركيز 30 مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 9.28 ساعة عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة إذ اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في زمن الجيل لطفيلي الشمانيا الجلدية المعاملة بعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب مقارنة مع نموذج السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

جدول (17) تأثير عقار الامفوترسين اللايوسومي ب في نمو بروماستكوت الشمانيا الجلدية (*L. tropica*) (خلية×10⁶)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة)
% تنشيط	*المعدل ± الخطأ القياسي	% تنشيط	*المعدل ± الخطأ القياسي	% تنشيط	*المعدل ± الخطأ القياسي	% تنشيط	*المعدل ± الخطأ القياسي	المعاملة (مايكروغرام/مل) Control 5 10 20 25 30
--	0.95 ± 32.80 ^a	--	0.49 ± 44.16 ^a	--	1.15 ± 22.06 ^a	--	0.23 ± 2.30 ^a	
50	0.63 ± 16.10 ^b	49	0.05 ± 22.40 ^b	51	0.60 ± 10.73 ^b	50	0.03 ± 1.13 ^b	
78	0.63 ± 7.20 ^c	82	0.08 ± 7.93 ^c	72	0.17 ± 6.03 ^c	77	0.04 ± 0.51 ^c	
88	0.45 ± 3.90 ^d	90	0.60 ± 4.13 ^d	98	0.15 ± 0.43 ^d	94	0.01 ± 0.12 ^d	
94	0.20 ± 1.86 ^e	97	0.04 ± 1.07 ^e	99	0.07 ± 0.27 ^d	95	0.01 ± 0.10 ^d	
98	0.05 ± 0.50 ^e	98	0.15 ± 1.02 ^e	100	0.01 ± 0.10 ^d	97	0.00 ± 0.06 ^d	

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (18) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في عدد الجيل لبروماستكوت الشمانيا

L. tropica الجلدية

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.04 ± 7.32^a	0.01 ± 7.75^a	0.07 ± 6.75^a	0.14 ± 3.48^a	Control
0.05 ± 6.30^b	0.00 ± 6.77^b	0.08 ± 5.71^b	0.04 ± 2.47^b	5
0.13 ± 5.13^c	0.01 ± 5.28^c	0.04 ± 4.88^c	0.12 ± 1.33^c	10
0.16 ± 4.24^d	0.21 ± 4.30^d	0.49 ± 0.91^d	0.15 ± 1.12^d	20
0.16 ± 3.17^e	0.05 ± 2.39^e	0.21 ± 0.73^e	0.23 ± 0.95^e	25
0.17 ± 1.27^f	0.22 ± 2.29^e	0.02 ± 0.51^f	0.01 ± 0.75^f	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب

اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (19) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في زمن الجيل لبروماستكوت الشميانيا

L. tropica الجلدية

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.07 ± 13.10^f	0.02 ± 9.28^e	0.08 ± 7.10^d	0.29 ± 6.92^e	Control
0.14 ± 15.24^{de}	0.00 ± 10.62^e	0.12 ± 8.40^d	0.16 ± 9.71^e	5
0.46 ± 18.75^{cd}	0.04 ± 13.63^d	0.08 ± 9.83^d	1.62 ± 18.35^d	10
0.82 ± 22.72^c	0.85 ± 16.80^c	0.17 ± 16.92^c	1.33 ± 25.27^c	20
1.57 ± 30.40^b	0.73 ± 30.14^b	2.81 ± 26.99^b	1.15 ± 32.21^b	25
3.62 ± 68.02^a	2.11 ± 34.69^a	0.00 ± 47.10^a	1.01 ± 45.87^a	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب

اختبار دنكن احادي الاتجاه

5.4 تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية

Effect of Liposomal amphotericin B on the growth, generation number and generation time of *L. donovani*

يبين الجدول (20) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب وبتركيز مختلفة تراوحت ما بين (5 - 30) مايكروغرام/ مل على نمو بروماستكوت الشمانيا الاحشائية مقارنة مع الشمانيا غير المعاملة (السيطرة). اذ لاحظ ان للعقار تأثيرا تثبيطيا وأن هناك علاقة عكسية بين معدل النمو لبروماستكوت الطفيلي مع زيادة تركيز العقار وقد تراوحت نسبة تثبيط العقار عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة ما بين (50 - 98)% للتركيز من 5 - 30 مايكروغرام/ مل وان تركيز IC_{50} هو 5 مايكروغرام/ مل في حين تركيز IC_{90} هو 25 مايكروغرام/ مل.

وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ لطيفليات المعاملة بعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب ضمن فترة التعريض مقارنة مع نموذج السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

ويبين الجدول (21) التأثير التثبيطي لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب على عدد الجيل اذ لاحظ بان ازدياد تركيز العقار يقلل من عدد الجيل لطيفلي الشمانيا الاحشائية وبازدياد فترة التعريض مقارنة مع مجموعة السيطرة بعلاقة عكسية عند الطور اللوغارتمي للنمو 72 ساعة وان عدد الجيل 6.77 جيل عند تركيز 5 مايكروغرام/ مل و 1.67 جيل عند تركيز 30 مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 7.78 جيل.

واظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في اعداد الجيل لطيفلي الشمانيا الاحشائية المعاملة مقارنة مع نموذج السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

ويبين الجدول (22) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب على زمن الجيل فقد كانت العلاقة طردية اذ كلما زاد تركيز العقار ازداد زمن الجيل وقد تراوح زمن الجيل ما بين 10.63 ساعة عند تركيز 5 مايكروغرام/ مل الى 44.61 ساعة عند تركيز 30 مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 9.25 ساعة عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

وقد اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في زمن الجيل لطيفلي الشمانيا الاحشائية المعاملة مقارنة مع نموذج السيطرة بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

جدول (20) تأثير عقار الامفوترسين اللايوسومي ب في نمو بروماسكتوت الشمانيا الاحشائية *L. donovani* (خلية×10⁶)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة)	المعاملة (مايكروغرام/مل) Control
تنشيط %	*المعدل ± الخطأ القياسي	تنشيط %	*المعدل ± الخطأ القياسي	تنشيط %	*المعدل ± الخطأ القياسي	تنشيط %	*المعدل ± الخطأ القياسي		
---	0.51 ± 37.20 ^a	---	0.58 ± 44.83 ^a	---	0.66 ± 22.16 ^a	---	0.05 ± 3.70 ^a		
49	0.84 ± 18.96 ^b	50	0.41 ± 22.31 ^b	43	0.63 ± 12.60 ^b	48	0.11 ± 1.90 ^b		5
60	0.20 ± 14.86 ^c	64	0.54 ± 15.86 ^c	80	0.26 ± 4.36 ^c	75	0.02 ± 0.90 ^c		10
83	0.40 ± 6.13 ^d	80	0.05 ± 4.30 ^d	96	0.14 ± 0.70 ^d	88	0.04 ± 0.42 ^d		20
91	0.25 ± 3.20 ^e	94	0.45 ± 2.48 ^e	98	0.08 ± 0.44 ^d	90	0.01 ± 0.35 ^{de}		25
95	0.23 ± 1.86 ^e	98	0.10 ± 0.66 ^f	99	0.01 ± 0.20 ^d	94	0.02 ± 0.20 ^e		30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول رقم (21) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في عدد الجيل لبروماستكوت اللشمانيا

L. donovani الاحشائية

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.01 ± 7.51^a	0.01 ± 7.78^a	0.04 ± 6.76^a	0.02 ± 4.18^a	Control
0.06 ± 6.53^b	0.02 ± 6.77^b	0.07 ± 5.94^b	0.08 ± 3.21^b	5
0.02 ± 6.18^c	0.05 ± 6.28^c	0.08 ± 4.41^c	0.04 ± 2.14^c	10
0.09 ± 4.90^d	0.02 ± 4.39^d	0.31 ± 1.71^d	0.14 ± 1.03^d	20
0.10 ± 3.96^e	0.28 ± 3.55^e	0.28 ± 1.07^e	0.07 ± 0.77^e	25
0.17 ± 3.17^f	0.22 ± 1.67^f	0.01 ± 0.95^f	0.02 ± 0.25^f	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب

اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (22) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في زمن الجيل لبروماستكوت اللشمانيا

L. donovani الاحشائية

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.03 ± 12.78^e	0.02 ± 9.25^d	0.04 ± 7.10^f	0.03 ± 5.74^e	Control
0.14 ± 14.69^d	0.04 ± 10.63^d	0.09 ± 8.07^{de}	0.20 ± 7.48^e	5
0.04 ± 15.52^d	0.09 ± 11.46^d	0.21 ± 10.88^d	0.24 ± 11.23^d	10
0.37 ± 19.59^c	0.08 ± 16.42^{bc}	1.55 ± 24.32^c	1.29 ± 20.83^c	20
0.65 ± 24.27^b	1.72 ± 20.54^b	1.87 ± 40.11^b	1.77 ± 33.96^b	25
0.80 ± 31.98^a	6.03 ± 44.61^a	0.00 ± 86.49^a	0.00 ± 54.10^a	30

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب

اختبار دنكن احادي الاتجاه

يبين كل من الجدول (17)، (20) تأثير عقار الامفوترسين اللايبوسومي ب على نمو طفيلي الشمانيا الجلدية والاحشائية بنسبة تثبيط 50% و 90%، دراسات عديدة وأبحاث متنوعة اجريت لإيجاد علاج فعال ضد الشمانيا ومن أبرز العلاجات استعمال الامفوترسين اللايبوسومي ب . أما فيما يتعلق بميكانيكية عمل لامفوترسين اللايبوسومي ب هو قدرته على التغلغل والوصول الى موقع الإصابة بالإرتباط بجدار الفطر ومنه يتحرر الامفوترسين ب من الجزء اللايبوسومي ويدخل جدار الخلية ويرتبط بالارجوستيرول Ergosterol الموجود في الغشاء الخلوي و سوف يغير هذا الارتباط من نفاذية غشاء الخلية محدثاً ثغور والتي من خلالها يحصل فقدان للأيونات و حدوث الصدمة الايضية وموت الخلية الفطرية او الطفيلية في درجة حرارة الجسم فهي تُعد عاملاً مهماً يساعد على نقل الامفوترسين ب (Shirzadi, 2019). ففي الهند تم استعمال هذا العلاج ضد نوعين من الشمانيا هما *L. donovani* و *L. major* لكونه امن وفعال (Wijnant et al., 2018) وقد أشار (Sundar and Chakravart, 2010) ان سبب فشل استعمال الامفوترسين ب على الرغم من أنه علاج ممتاز لقتل الطفيلي بنسبة تثبيط 100% عند تركيز 0.75 – 1.0 ملغم/كغم لمدة 15 – 20 يومياً حقن وريدي او بايام متبادلة عند تكرار العلاج فإنه يسبب الحمى، القشعريرة وذي سمية عالية ويسبب نقص بوتاسيوم الدم، التسمم الكلوي والقلبي ومن ثم الموت فضلاً عن كلفته العالية . على العكس من الامفوترسين اللايبوسومي ب اذ أن جرعة 5 ملغم/ كغم يومياً يكون ذا معدل سمية واطئ جداً في الجسم الحي مقارنة مع المفعول العالي ضد الطفيلي. ويتفق ذلك مع اشارة بعض الباحثين على أن الامفوترسين اللايبوسومي ب هو علاج آمن وفعال للغاية ضد الشمانيا الاحشائية في الهند وبنكلادش والنيبال ويوصى به كخط اول لعلاج الشمانيا من منظمة الصحة العالمية حول مكافحة الشمانيات كذلك يعتبر علاج ضد الالتهابات الفطرية وعينت الجرعة الأولية المعطاة بدعم من جمعية الصحة والبرنامج الوطني RajendraMemorial Research Institute (RMRI) ب 4 – 5 ملغم/ كغم على مدى 5 – 10 ايام بحسب الحالة السريرية ووضحت المنظمة انه يمكن تحقيق نتائج ايجابية للغاية بجرعة 15 – 20 ملغم/ كغم جرعة اجمالية اذ اظهرت معدلات شفاء عالية جداً ومعدلات منخفضة من التفاعلات العكسية والانتكاسات (Balasegarm et al., 2012).

بحسب ما اشار اليه (Berman, 2019) ان جرعة 20 ملغم/ كغم من الامفوترسين اللايبوسومي ب كافية لتعطي معدل شفاء ضد الشمانيا الجلدية والمخاطية الجلدية بمعدل 58% في العالم القديم و 27% في العالم الحديث للشمانيا الجلدية ومعدل 57% لحالات الشمانيا المخاطية الجلدية وأن جرعة 15 ملغم/ كغم كافية لعلاج PKDL وبمعدل 3 ملغم/ كغم لخمس اوقات لمدة 15 يوم تكفي لشفاء 78% في شرق افريقيا والهند. ووجد أن الشمانيا الاحشائية المتسببة عن *L. donovani* يعطى لها جرعة من الامفوترسين اللايبوسومي ب مقدارها 10 ملغم/ كغم والتي تكون

كافية لعلاج 58% من المرضى وأن سبع جرعات بمقدار 3 ملغم/ كغم كافية لشفاء 85% من الاصابات. ووجد (Burnett *et al.*, 2021) أن الجرعة الشائعة للامفوترسين اللايبوسومي ب 3 - 5 ملغم/ كغم من وزن الجسم وقد يصاب الاشخاص في اثناء تلقيهم العلاج بنقص البوتاسيوم فيجب المراقبة اثناء اعطائهم العلاج بجرعات عالية واذا حدث نقص في مستوى البوتاسيوم فيجب ايقاف العلاج ومعادلة نقصه في الجسم.

وقد استخدم الامفوترسين اللايبوسومي وحسب ما جاء ببحوث أخرى في علاج الاصابات الرئوية بفطر الـ *Aspergillosis* او ما يسمى بداء الرشاشيات الرئوي المزمن واستخدام الامفوترسين اللايبوسومي بجرعة 25 ملغم مرتين اسبوعياً لمدة شهرين وتتبع بجرعة مقوية مقدارها 25 ملغم مرة واحدة اسبوعياً لمدة 6 اشهر للمرضى المعتمدين على بريدنيزولون بإيصال الدواء مباشرة الى موقع العدوى الفطرية (Hanada *et al.*, 2014). إذ وضح (Shirzadi, 2019) الى أن الجرعة المقررة حسب منظمة الغذاء والدواء العالمية لعلاج اللشمانيا هي 3 ملغم/ كغم يومياً لسبعة جرع تعطى للأيام (1 - 5، 14، 21) أي بجرعة تصل الى 21 ملغم/ كغم وقد سجل نجاحاً كبيراً ضد اللشمانيا الجلدية والاحشائية. وبين الباحثون مثل (Drewett *et al.*, 2021) أن الامفوترسين اللايبوسومي ب المضاد للفطريات والطفيليات ينتج الجسم الشحمي حويصلة كروية حول جزيئات الامفوترسين ب ليغير حركته الدوائية ويقلل سميته للبشر ويرتبط بجدار الخلية المستهدفة ولوحظ حدوث تسمم قلبي بسبب الجرعات المتتالية والتي تتسبب بفرط البوتاسيوم في الدم مسببة التسمم القلبي وتوقف القلب الانقباضي. وقد اشار (Cuddihy *et al.*, 2019) الى ان الامفوترسين ب يسبب تجمع Reactive Oxygen Species (ROS) داخل الخلية الذي يلعب دور المضاد للخلية الفطرية لارتفاعه. مما يتفق مع (Shadab *et al.*, 2017) اذ اثبت ان Kalsome TM10 يؤدي الى فقدان إمكانات غشاء المايكوندريا وتحطمه في بروماستكوت اللشمانيا واستفاد الـ ATP وزيادة في انتاج ROS ونقص في مستوى الـ GSH وازدياد فعالية Caspas-like وكبح نشاط الدورة الخلوية وتجزئة الـ DNA.

6.4 التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب والثاليدومايد عند تثبيت تركيز الامفوترسين عند 2.5 مايكروغرام/ مل في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية

Effect of Synergism between Liposomal Amphotericin B and Thalidomide (Not: Liposomal Amphotericin B Fixed at 2.5µg/ml) on *L. tropica* and *L. donovani*

أظهرت الجداول (23) (24) التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب بعد تثبيته عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الثاليدومايد من (0.25 – 2.0) مايكروغرام/ مل على معدل نمو بروماستكوت اللشمانيا الجلدية واللشمانيا الاحشائية مقارنة مع نموذج السيطرة للنوعين ونلاحظ من الجدول التأثير التثبيطي للعقارين سوياً بعلاقة عكسية بين معدل النمو لبروماستكوت الطفيلي لكلا النوعين مع زيادة تركيزي العقارين سوية اذ كلما زاد التركيز قلت اعداد الطفيليات وازدادت نسبة التثبيط وقد تراوحت نسبة التثبيط للعقارين ما بين (35 – 79%) لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية وكانت قيمة IC_{50} عند تركيز (0.5 + 2.5) مايكروغرام/ مل عند الطور اللوغارتمي كما في الجدول (23) في حين كانت النسبة المئوية لتثبيط العقارين ما بين (38 – 57%) لبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية وان قيمة IC_{50} عند تركيز (1 + 2.5) مايكروغرام/ مل عند الطور اللوغارتمي كما في الجدول (24). وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ ضمن فترة التعريض بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

يبين الجدولان (25) (26) التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب والثاليدومايد بتثبيت الامفوترسين اللايبوسومي عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تراكيز الثاليدومايد على بروماستكوت كل من *L. tropica* و *L. donovani* وقد لاحظ انه مع زيادة التركيز للعقارين كليهما سوية هناك تناقص في عدد الجيل عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة اذ يوضح الجدول (25) ان عدد الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية عند تركيز (0.25 – 2.5) مايكروغرام/ مل هو 7.08 جيل وبلغ 5.44 جيل عند تركيز (2 + 2.5) مقارنة مع نموذج السيطرة (7.70) جيل عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

أما بالنسبة لبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية فيشير الجدول (26) ان عدد الجيل عند تركيز (0.25 + 2.5) مايكروغرام/ مل كان 7.08 جيل في حين بلغ 6.55 جيل عند تركيز (2 + 2.5) مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 7.79 جيل عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

واظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في اعداد الجيل لطفيلي اللشمانيا الجلدية والاحشائية بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

فضلا عن ذلك فقد وجدت زيادة طردية في زمن الجيل مع ازدياد التركيز وباستخدام العقارين كليهما عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة كما في الجدولين (27)،(28).

ووضح الجدول (27) ان الزيادة التدريجية في زمن الجيل عند تركيز (2.5 + 0.25) مايكروغرام/ مل كان 10.16 ساعة ليصل الى 13.22 ساعة عند تركيز (2 + 2.5) مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 9.35 ساعة.

أما الجدول (28) فيبين الزيادة في زمن الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية اذ بلغ عند (2.5 + 0.25) مايكروغرام/ مل 10.17 ساعة في حين كان عند تركيز (2 + 2.5) 10.98 ساعة مقارنة مع السيطرة 9.24 ساعة عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

وقد اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في زمن الجيل لطفيلي اللشمانيا الجلدية والاحشائية بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

الجدول (23) التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايوسومي ب والثاليدومايد بعد تثبيت الامفوترسين اللايوسومي عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الثاليدومايد في نمو بروماستكوت الشمانية الجلدية *L. tropica* (خلية 10^6)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة)	المعاملة (مايكروغرام/مل)
% تثبيت	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيت	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيت	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيت	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي		
---	1.18 $\pm$ 34.10 ^a	---	0.31 $\pm$ 42.45 ^a	---	0.99 $\pm$ 21.23 ^a	---	0.41 $\pm$ 2.30 ^a	Control	
37	0.60 $\pm$ 21.50 ^b	35	0.40 $\pm$ 27.66 ^b	5	1.33 $\pm$ 20.25 ^a	10	0.30 $\pm$ 2.06 ^a	2.5+0.25	
50	0.28 $\pm$ 17.00 ^c	50	0.64 $\pm$ 21.30 ^c	18	0.80 $\pm$ 17.43 ^b	30	0.20 $\pm$ 1.60 ^{ab}	2.5+0.5	
60	0.12 $\pm$ 13.43 ^d	60	0.49 $\pm$ 16.96 ^d	27	0.20 $\pm$ 15.96 ^b	50	0.07 $\pm$ 1.15 ^{bc}	2.5+1	
69	0.68 $\pm$ 10.60 ^e	79	0.47 $\pm$ 8.93 ^e	30	0.28 $\pm$ 14.96 ^b	66	0.01 $\pm$ 0.77 ^c	2.5+2	

*الأرقام تمثل المعدل لثلاث مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (24) التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايوسومي ب والثاليديومايد بعد تثبيت عقار الامفوترسين اللايوسومي عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الثاليديومايد في نمو بروماستكوت الشمانيا الاحشائية *L. donovani* (خلية×10⁶)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة)	المعاملة (مايكروغرام/مل)
% تثبيت	*المعدل ± الخطأ القياسي	% تثبيت	*المعدل ± الخطأ القياسي	% تثبيت	*المعدل ± الخطأ القياسي	% تثبيت	*المعدل ± الخطأ القياسي		
---	0.87 ± 31.53 ^a	---	0.55 ± 44.80 ^a	---	0.05 ± 22.50 ^a	---	0.72 ± 2.63 ^a	Control	
21	0.60 ± 24.86 ^b	38	0.28 ± 27.60 ^b	3	0.23 ± 21.80 ^{ab}	37	0.09 ± 1.65 ^b	2.5+0.250	
31	0.86 ± 21.60 ^c	44	0.95 ± 25.13 ^c	6	0.37 ± 21.13 ^b	50	0.07 ± 1.30 ^c	2.5+0.5	
48	0.62 ± 16.40 ^d	50	1.03 ± 22.16 ^d	19	0.44 ± 18.33 ^c	60	0.02 ± 1.05 ^c	2.5+1	
64	0.47 ± 11.43 ^e	57	0.31 ± 19.16 ^e	49	0.52 ± 11.10 ^d	82	1.89 ± 0.45 ^d	2.5+2	

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (25) التأثير التازر لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في عدد الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على بروماستكوت اللشمانيا الجلدية

L. tropica

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	
0.05 ± 7.38 ^a	0.01 ± 7.70 ^a	0.01 ± 6.69 ^a	0.16 ± 3.64 ^a	Control
0.04 ± 6.71 ^b	0.02 ± 7.08 ^b	0.02 ± 6.54 ^b	0.11 ± 3.12 ^b	2.5+0.25
0.02 ± 6.38 ^c	0.04 ± 6.70 ^c	0.04 ± 6.48 ^b	0.19 ± 2.94 ^b	2.5+0.50
0.01 ± 6.04 ^d	0.04 ± 6.37 ^d	0.04 ± 6.29 ^c	0.09 ± 2.48 ^c	2.5+1
0.09 ± 5.69 ^e	0.07 ± 5.44 ^e	0.02 ± 6.19 ^c	0.02 ± 1.92 ^d	2.5+2

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (26) التأثير التازري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في عدد الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على بروماستكوت اللشمانيا

L. donovani الاحشائية

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	
0.04 ± 7.27 ^a	0.02 ± 7.79 ^a	0.00 ± 6.78 ^a	0.10 ± 3.58 ^a	Control
0.03 ± 6.93 ^b	0.01 ± 7.08 ^b	0.01 ± 6.74 ^a	0.08 ± 3.01 ^b	2.5+0.25
0.05 ± 6.72 ^c	0.05 ± 6.94 ^c	0.02 ± 6.69 ^a	0.08 ± 2.66 ^b	2.5+0.50
0.05 ± 6.32 ^d	0.07 ± 6.76 ^d	0.03 ± 6.48 ^b	0.02 ± 2.31 ^c	2.5+1
0.05 ± 5.80 ^e	0.02 ± 6.55 ^e	0.07 ± 5.76 ^c	0.25 ± 1.40 ^d	2.5+2

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (27) التأثير التازري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في زمن الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على بروماستكوت الشمانيا الجلدية

L. tropica

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.08 ± 13.01^c	0.01 ± 9.35^c	0.07 ± 7.17^c	0.57 ± 6.70^d	Control
0.08 ± 14.29^d	0.02 ± 10.16^d	0.10 ± 7.24^{cd}	0.48 ± 7.32^{cd}	2.5+0.25
0.05 ± 15.05^c	0.07 ± 10.74^c	0.08 ± 7.48^b	0.58 ± 8.22^c	2.5+0.5
0.03 ± 15.89^b	0.07 ± 11.29^b	0.02 ± 7.63^{ab}	0.35 ± 9.68^b	2.5+1
0.28 ± 16.87^a	0.19 ± 13.22^a	0.03 ± 7.75^a	0.17 ± 12.50^a	2.5+2

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (28) التأثير التازري لعقاري الامفوترسين اللايبوسومي ب في زمن الجيل عند تثبيته بتركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز عقار الثاليدومايد على بروماستكوت الشمانيا

L. donovani الاحشائية

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.07 ± 13.20^c	0.02 ± 9.24^d	0.00 ± 7.07^c	0.19 ± 6.70^c	Control
0.06 ± 13.85^d	0.02 ± 10.17^c	0.00 ± 7.10^c	0.00 ± 8.19^d	2.5+0.25
0.11 ± 14.28^c	0.08 ± 10.37^c	0.02 ± 7.17^c	0.06 ± 9.28^c	2.5+0.5
0.13 ± 15.18^b	0.11 ± 10.65^b	0.03 ± 7.39^b	0.10 ± 10.36^b	2.5+1
0.17 ± 16.54^a	0.03 ± 10.98^a	0.10 ± 8.33^a	0.00 ± 12.79^a	2.5+2

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

7.4 التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب عند تثبيت تركيز عقار الثاليدومايد عند 2.5 مايكروغرام/ مل في نمو الجيل وعدده وزمنه لبروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية

Effect of Synergism Between Thalidomide and Liposomal Amphotericin B (Note: Thalidomide Fixed of 2.5µg/ml) on Growth, Generation Number and Time of *L. tropica* and *L. donovani*

تبين الجداول (29) (30) التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب بعد تثبيت الثاليدومايد عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب من (1 - 4) مايكروغرام/ مل على معدل نمو بروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية مقارنة مع نموذج السيطرة.

نلاحظ من الجداول التأثير التثبيطي للعقارين على معدل النمو ووجود علاقة عكسية بين معدل النمو وبين تراكيز العقارين في النوعين كليهما من الطفيلي اذ كلما زادت التراكيز قل معدل النمو وازدادت نسبة التثبيط المئوية.

يشير الجدول (29) الى ان نسبة التثبيط للعقارين تراوحت ما بين (24 - 71%) لبروماستكوت الشمانيا الجلدية وكان قتل 50% من البروماستكوت عند تركيز (2 + 2.5) مايكروغرام/ مل عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

يظهر الجدول (30) بأن النسبة المئوية للتثبيط للعقارين معاً لبروماستكوت الشمانيا الاحشائية تراوحت ما بين (45 - 64%) وان قتل 50% كانت عند تركيز (2 + 2.5) مايكروغرام/ مل عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

وقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ ضمن فترة التعريض بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

ويبين الجدولان (31) (32) التأثير التآزري للعقارين بعد تثبيت الثاليدومايد عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب على عدد الجيل اذ لاحظ انه كلما زاد تركيز العقارين سويًا يقل عدد الجيل لكلا النوعين من الطفيلي عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة. وقد كان عدد الجيل عند تركيز (1 + 2.5) مايكروغرام/ مل هو 7.26 جيل في حين بلغ 5.88 جيلاً عند تركيز (4 + 2.5) مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 7.66 جيلاً بالنسبة لبروماستكوت الشمانيا الجلدية، الجدول (31) أما بالنسبة للشمانيا الاحشائية فيبين الجدول (32) ان عدد الجيل كان

6.85 جيل عند تركيز (1 + 2.5) مايكروغرام/ مل ليصل 6.27 جيل عند تركيز (4 + 2.5) مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 7.72 جيل عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

واظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في اعداد الجيل لطفيلي اللشمانيا الجلدية والاحشائية بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

في حين يوضح الجدولين (33) (34) التأثير التثبيطي للتأزر بين عقاري الثاليدومايد والامفوترسين اللايوسومي ب تثبيت الثاليدومايد عند 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايوسومي ب في زمن الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية فقد لحظ زيادة زمن الجيل مع ازدياد تركيزي العقارين وبعلاقة طردية.

اذ يبين الجدول (33) الزيادة في زمن الجيل مع ازدياد التراكيز التأزرية للعقارين فعند تركيز (1 + 2.5) مايكروغرام/ مل كان زمن الجيل 9.90 ساعة وازداد ليصل الى 12.5 ساعة عند تركيز (4 + 2.5) مايكروغرام/ مل لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية مقارنة مع نموذج السيطرة 9.39 ساعة.

ويبين الجدول (34) الزيادة التدريجية في زمن الجيل لبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية فعند تركيز (1 + 2.5) مايكروغرام/ مل كان 10.5 ساعة وازداد ليصل الى 11.48 ساعة عند تركيز (4 + 2.5) مايكروغرام/ مل مقارنة مع نموذج السيطرة 9.31 ساعة عند الطور اللوغارتمي 72 ساعة.

وقد اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ في زمن الجيل لطفيلي اللشمانيا الجلدية واللشمانيا الاحشائية بعد مرور (24، 48، 72، 96) ساعة.

جدول (29) التأثير التازري لمقاري الثايدومايد بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايوسومي ب في نمو بروماسكتوت الشمانيا الجلدية *L. tropica* (خلية 10×10^6)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة) (مايكروغرام/مل) المعاملة
% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
--	0.92 $\pm$ 36.75 ^a	--	0.52 $\pm$ 41.36 ^a	--	0.56 $\pm$ 20.56 ^a	--	0.05 $\pm$ 2.40 ^a	Control
38	1.11 $\pm$ 22.85 ^b	24	1.15 $\pm$ 31.50 ^b	17	0.57 $\pm$ 17.10 ^b	33	0.05 $\pm$ 1.60 ^b	2.5+1
51	0.62 $\pm$ 17.85 ^c	49	1.00 $\pm$ 21.00 ^c	38	0.36 $\pm$ 12.66 ^c	57	0.01 $\pm$ 1.03 ^c	2.5+2
64	0.65 $\pm$ 13.31 ^d	67	0.33 $\pm$ 13.61 ^d	48	0.28 $\pm$ 10.70 ^d	60	0.08 $\pm$ 0.95 ^c	2.5+3
76	0.55 $\pm$ 8.85 ^e	71	0.40 $\pm$ 12.05 ^d	56	0.29 $\pm$ 9.02 ^e	68	0.01 $\pm$ 0.77 ^d	2.5+4

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (30) التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/ مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايوسومي ب في نمو بروماستكوت الشمانيا الاحشائية *L. donovani* (خلية $\times 10^6$)

96		72		48		24		فترة التعريض (ساعة) (مايكروغرام/مل) المعاملة
% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	% تثبيط	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
--	0.94 $\pm$ 32.55 ^a	--	0.05 $\pm$ 43.25 ^a	--	0.17 $\pm$ 21.90 ^a	--	0.11 $\pm$ 2.45 ^a	Control
45	0.14 $\pm$ 17.73 ^b	45	1.14 $\pm$ 23.53 ^b	7	0.10 $\pm$ 20.30 ^b	29	0.14 $\pm$ 1.75 ^b	2.5+1
54	0.57 $\pm$ 15.10 ^c	50	1.12 $\pm$ 21.26 ^b	17	0.03 $\pm$ 18.13 ^c	49	0.25 $\pm$ 1.25 ^c	2.5+2
71	0.43 $\pm$ 9.28 ^d	58	0.59 $\pm$ 18.21 ^c	40	1.01 $\pm$ 13.21 ^d	57	0.00 $\pm$ 1.05 ^c	2.5+3
77	0.08 $\pm$ 7.33 ^e	64	0.24 $\pm$ 15.77 ^d	51	0.05 $\pm$ 10.60 ^e	65	0.02 $\pm$ 0.85 ^c	2.5+4

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (31) التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في عدد الجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا

الجلدية *L. tropica*

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	
0.03 ± 7.49 ^a	0.02 ± 7.66 ^a	0.03 ± 6.65 ^a	0.03 ± 3.55 ^a	Control
0.06 ± 6.80 ^b	0.05 ± 7.26 ^b	0.04 ± 6.39 ^b	0.05 ± 2.97 ^b	2.5+1
0.05 ± 6.45 ^c	0.07 ± 6.68 ^c	0.04 ± 5.95 ^c	0.01 ± 2.34 ^c	2.5+2
0.07 ± 6.02 ^d	0.03 ± 6.05 ^d	0.04 ± 5.71 ^d	0.07 ± 2.09 ^d	2.5+3
0.08 ± 5.43 ^e	0.04 ± 5.88 ^e	0.04 ± 5.46 ^e	0.00 ± 1.89 ^e	2.5+4

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (32) التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في عدد الجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا

الاحشائية *L. donovani*

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	*المعدل ± الخطأ القياسي	
0.04 ± 7.31 ^a	0.00 ± 7.72 ^a	0.01 ± 6.75 ^a	0.06 ± 3.58 ^a	Control
0.01 ± 6.44 ^b	0.06 ± 6.85 ^b	0.00 ± 6.63 ^a	0.12 ± 3.06 ^b	2.5+1
0.05 ± 6.20 ^c	0.03 ± 6.63 ^c	0.00 ± 6.47 ^b	0.24 ± 2.53 ^c	2.5+2
0.06 ± 5.50 ^d	0.04 ± 6.48 ^d	0.11 ± 6.01 ^c	0.00 ± 2.36 ^{cd}	2.5+3
0.01 ± 5.17 ^c	0.02 ± 6.27 ^c	0.00 ± 5.70 ^d	0.04 ± 2.05 ^d	2.5+4

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (33) التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في زمن الجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا

الجلدية *L. tropica*

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.06 ± 12.81^e	0.02 ± 9.39^e	0.04 ± 7.21^e	0.06 ± 6.75^e	Control
0.14 ± 14.11^d	0.06 ± 9.90^d	0.05 ± 7.52^d	0.14 ± 8.09^d	2.5+1
0.11 ± 14.89^c	0.11 ± 10.78^c	0.05 ± 8.06^c	0.07 ± 10.26^c	2.5+2
0.19 ± 15.94^b	0.07 ± 11.89^b	0.05 ± 8.40^b	0.39 ± 11.50^b	2.5+3
0.29 ± 17.68^a	0.09 ± 12.25^a	0.07 ± 8.78^a	0.03 ± 12.72^a	2.5+4

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

جدول (34) التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد في زمن الجيل بعد تثبيته عند تركيز 2.5 مايكروغرام/مل وتغير تركيز الامفوترسين اللايبوسومي ب لبروماستكوت اللشمانيا

الاحشائية *L. donovani*

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة (مايكروغرام/مل)
*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	*المعدل $\pm$ الخطأ القياسي	
0.07 ± 13.12^e	0.00 ± 9.31^e	0.01 ± 7.11^d	0.12 ± 6.70^e	Control
0.02 ± 14.90^d	0.09 ± 10.50^d	0.00 ± 7.23^{cd}	0.12 ± 7.51^d	2.5+1
0.13 ± 15.46^c	0.06 ± 10.85^c	0.00 ± 7.42^c	0.00 ± 9.10^c	2.5+2
0.21 ± 17.45^b	0.04 ± 11.18^b	0.15 ± 7.99^b	0.03 ± 10.16^b	2.5+3
0.51 ± 18.57^a	0.04 ± 11.48^a	0.01 ± 8.42^a	0.28 ± 11.68^a	2.5+4

* تمثل الأرقام المعدل لثلاثة مكررات $\pm$ الخطأ القياسي SE

** تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ بحسب اختبار دنكن احادي الاتجاه

تبين لنا في النتائج التي تتعلق بالتأزر ما بين العقارين سمية عالية للأدوية في بروماستكوت اللشمانيا اذ عند تثبيت الامفوترسين اللايوسومي ب حصل تثبيط لـ 50% من البروماستكوت وتغير في عدد الجيل وزمنه. وقد تم الإشارة الى آلية عمل الامفوترسين اللايوسومي ب وذلك بارتباطه ب Ergosterol Sterol لجدار اللشمانيا و Cholesterol للخلايا الملتزمة للمضيف وتكوين فتحات مائية بغشاء البروماستكوت تغير الازموزية وتسبب زيادة النضوحية ومن ثم تحلل الخلية وتضعف قدرة البروماستكوت على الارتباط بالخلية الملتزمة (Ren *et al.*, 2021)

مما يتفق مع ما جاء به (Tiexeira-Santos *et al.*, 2016) اذ اشار الى ان التأزر ما بين الامفوترسين اللايوسومي ب ومضادات البكتريا Antibacterial او مضادات الفطريات Antifungal يقلل من عدد الخلايا للفطريات وفعاليتها مع زيادة فترة التعريض. واكد بعض الباحثين الى أن التأزر ما بين الامفوترسين اللايوسومي ب والسيلينيوم يعطينا كفاءة عالية كعلاج للشمانيا الجلدية اذ لوحظ انه ذا تاثير على الشكل والحجم لكل من البروماستكوت والامستكوت مع قدرة ممتازة لتثبيط الطفيلي داخل الخلية وخارجها ويلحظ انه لم يتم تسجيل أية سمية للعقار الجديد (Mostafavi *et al.*, 2019). فضلا عن ذلك فأن التأزر ما بين علاج Sodium Stibogluconate الفموي و Allopurinol يعطي نتائج فعالة وايجابية بالنسبة لمرضى اللشمانيا الجلدية مما لو اعطي كل عقار لوحده، اذ قلل مدة العلاج من 6-9 الى 3-6 اسابيع بحسب حجم الآفة الجلدية (Rashid *et al.*, 2020).

وانفق بعض الباحثين على أن تأثير الامفوترسين على طفيلي اللشمانيا بأنواعها بالارتباط ب Ergosta-type sterols أنها من مكونات الغشاء البلازمي والتي تكون الثغور وتؤدي الى فقدان ايونات البوتاسيوم وتقود الى التأثير السام في حالة فقدان المواد الايونية من داخل الخلية وحث تحطيم القواعد التأكسدية Ros-based الموجودة. وقد لاحظ بان التأثير التأزري لـ Allicin مع AMB يعمل على تحفيز تعطيل وظيفة الغشاء الخلوي للطور غير المسوط داخل الخلايا واحتمالية تأثير Allicin المباشر على عملية اختزال Tyrpanothione او وظائف الماييتوكونديريا (Intakhan *et al.*, 2020). كما بين (Corral *et al.*, 2014) ان استخدام التأزر بين AMB و Allicin وبتراكيز (0.07 AMB + 35.45 Allicin) مايكرومول تثبط الامستكوت بنسبة 95% اذ يعمل Allicin على تحسين فعالية AMB وتعزيزها على امستكوت اللشمانيا *L. infantum* و *L. donovani* وتركيز (0.05 AMB+10 Allicin) مايكرومول سوف يثبط 50% IC₅₀ منه. ويقلل التأزر داخل الجسم الحي للعقارين من السمية مقارنة بالعقارات المفردة.

وأكد (Al-Ogaili, 2016) ان المستخلصات المائية لنباتي الحنة Lawsonia inermis والحرمل Harmala peganum يحتويان على مضادات مهمة للطفيليات اذ تم اختبار فعاليتها على بروماستكوت *L. tropica* وقد تم تحضير مستخلص نبات الحنة بتركيز (1.25، 2.5، 5) % ولنبات الحرمل بتركيز (2.5، 5، 10) % كما حضرت تراكيز بدمج المستخلصين معاً، وتم حساب معدل التثبيط لكل مستخلص نباتي منفردا ومجموعا وتبين من النتائج ان التراكيز الواطئة والمتوسطة المندمجة ذات فعالية تثبيطية عالية مقارنة بالتراكيز العالية.

اما بالنسبة لآلية عمل الثاليدومايد بحسب ماجاء به (Mercurio et al., 2017) فيعد معدل مناعي ومضاد للالتهابات ويستعمل لعديد من الامراض الجلدية في زيادة تدهور TNF α -mRNA ويختزل انتاج TNF α عن طريق الخلايا أحادية النواة والخلايا الملتزمة التي تحفز بـ Lipopolysaccharid او T Lymphocytes اذ ان الية العمل تكمن في خفض مستوى TNF α ومنع نشاط NF-kB الذي يقلل بدوره من انتاج البروتين IL-6 المهم في انتشار الخلايا والالتهابات وضمور الاوعية الدموية وبالتالي الموت المبرمج.

وقد اكد (Solgi et al., 2006) ان التازر بين الثاليدومايد والكلوكانثيم كان له الأثر في علاج *L. major* اذ تم حقن وسادة قدم الفئران بالشمانيا واعطائها العلاج بجرعة 30 ملغم / كغم/ يوميا بالثاليدومايد مع 200 ملغم/ كغم/ يوميا بالكلوكانثيم واستمر العلاج لمدة 12 يوماً وأشار الى أن العلاج المركب اكثر فعالية من العلاج المفرد. اذ لوحظ قلة تورم وسادة قدم الفار عند حقن العلاجين معا مقارنة فيما لو كان كل لوحده ومن دراسة السايوتوكين لحظ ان تأثير الثاليدومايد لا يعتمد على الانترلوكين IL-12 ولكنه يرفع تنظيم انتاج الـ IFN-gamma وينقص تنظيم انتاج IL-10.

وأشار (Li et al., 2020) الى الدور التازري لعقار الثاليدومايد والازوثيوبرين في علاج مرض Crohn's اذ يعد TNF- α عاملا فعالا في العملية الالتهابية ومن المعروف ان الثيوبورينات لها قابلية تازرية مع الادوية المضادة للنخر لذا نحصل على تعديل مناعي للخلايا التائية ويعد العلاج المدمج علاجاً فعالاً حقيقياً للأشخاص الذين فقدوا الاستجابة للعلاج المفرد.

بينت دراسة أخرى حديثة ان التأثير التازري لعقاري Glucocorticoid و Thlidomide لعلاج COVID-19 وبجرعات منخفضة لديه فعالية دوائية ممتازة وامنة في تقليل الالتهاب الرئوي الحاد وتثبيط انتاج السيتوكسينات للمرضى المصابين بفائرس كورونا وتعزيز المناعة للمرضى الذين هم بحالة خطيرة، وتم استخدام هذا التازر في علاج مرض سارس الرئوي SARS وفايروس الانفلونزا H1N1 باختزال الالتهاب وتثبيط السيتوكينات (Li et al., 2021). ووضح (Upputuri et al., 2020) ان الثاليدومايد من الادوية الفعالة لعلاج مرض الجذام Erythema Nodosum Leprosum (ENL). ووجدت دراسات عديدة ان التازر

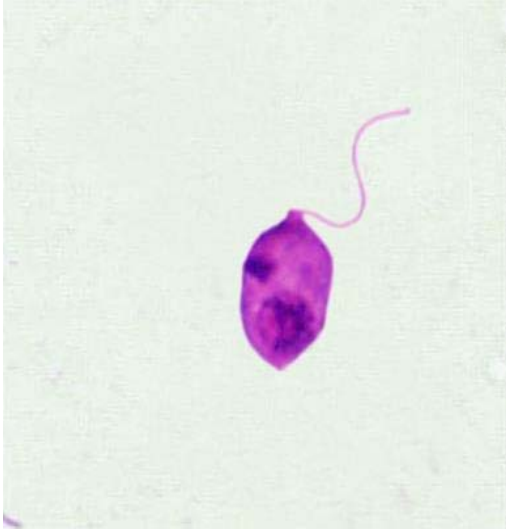
بين Thalidomide و Prednisolone او Clofazimine يعطي نتائج اسرع واستجابة سريرية جلدية وجهازية وقلة في الانتكاسات وشفاء تام في فترة علاج 20 أسبوعاً. وقد أشار (Vilchez-Sanchez *et al.*, 2022) الى ان بعض علامات الامراض الجلدية تتوقف بعد استعمال التازر بين Thalidomide و Bortezomib التي من المفترض ان المظاهر المناعية تاترت بها وقام الثاليدومايد بدور المثبط لانتاج $TNF-\alpha$ وتحسين انتاج السايوتوكين وفعالية السايوكين لخلايا T-Cell و NK-Cell ويسبب الشفاء للمرضى.

8.4 تأثير الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب والتأزر بينهما في الشكل الخارجي لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية

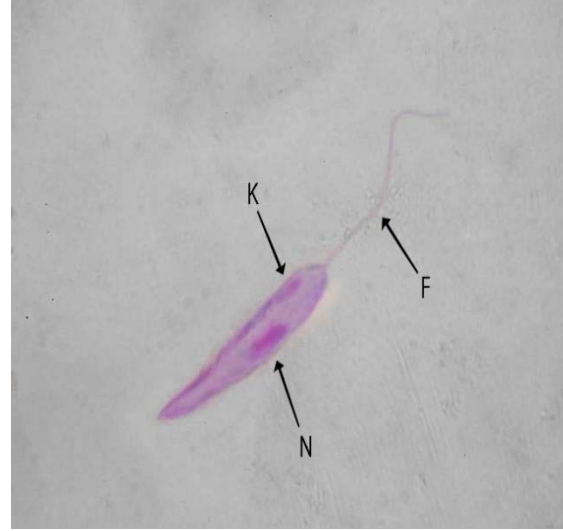
Effect of Thalidomide and Liposomal Amphotericin B and Synergism of them on Morphology of *L. tropica*, *L. donovani* Promastigite

تأثير الادوية واضح على نمو بروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية وشكلها وحجمها فيبدو من خلال السلايدات المحضرة والمصبوغة تغير في شكل البروماستكوت من الشكل المغزلي الى الشكل البيضوي او الدائري او الشكل غير منتظم مع ظهور تشققات في الغشاء البلازمي.

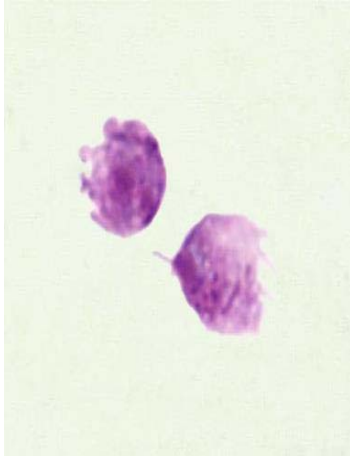
اذ يظهر الشكل (19) اللشمانيا الجلدية غير المعاملة التي تمتاز بشكلها المغزلي واحتوائها على النواة الواضحة والسوط والجسم الحركي بينما يشير الشكل (20) الى تأثير عقار الثاليدومايد عند تركيز 10 مايكروغرام/ مل وقد تحول شكل البروماستكوت لـ *L. tropica* من الشكل المغزلي المتطاول الى الشكل الكروي مع انتفاخ في حجم وشكل الطفيلي، أما الشكل رقم (21) فيشير الى الشكل غير المنتظم لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية المعاملة بالامفوترسين اللايبوسومي ب بنسبة تثبيط 50% عند تركيز 5 مايكروغرام/ مل عند الطور اللوغارتمي وتحول الشكل من المغزلي الى المتطاول. ويظهر الشكلان (22) و(23) التأثير التآزري لعقاري الثاليدومايد والامفوترسين ويلحظ تغير واضح في شكل البروماستكوت الى الدائري او البيضوي مع حدوث انحلال في الغشاء البلازمي.



الشكل (20) Promastigote اللشمانيا
الجلدية *L. tropica* المعاملة بالتالييدومايد
IC₅₀



الشكل (19) Promastigotes اللشمانيا
الجلدية *L. tropica* غير المعاملة
N: النواة، F: السوط، K الجسم الحركي



الشكل (23)
Promastigote اللشمانيا
الجلدية *L. tropica*
المعاملة بالتازر IC₅₀
(بتثبت التاليدومايد)



الشكل (22)
Promastigote اللشمانيا
الجلدية *L. tropica* المعاملة
بالتازر IC₅₀
(بتثبت الامفوترسين ب)

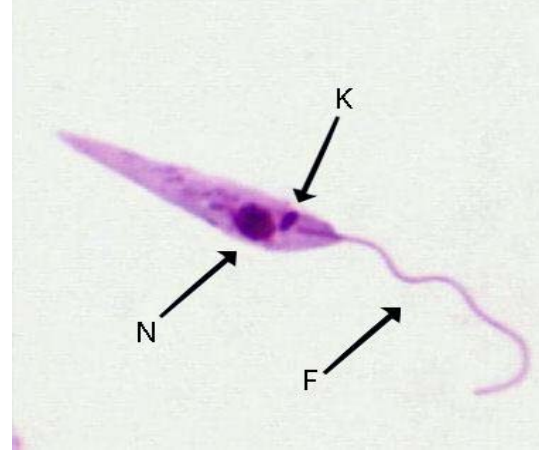


الشكل (21)
Promastigote
اللشمانيا الجلدية *L. tropica*
المعاملة IC₅₀ بالامفوترسين
اللايوسومي

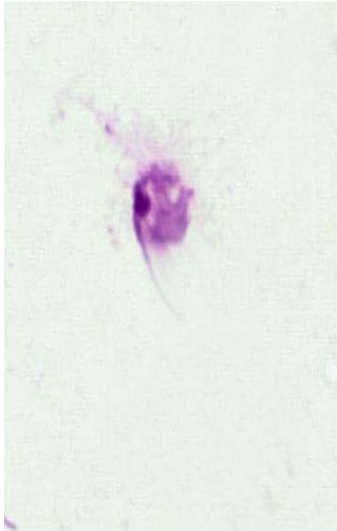
وفيما يتعلق باللشمانيا الاحشائية *L. donovani* فقد لاحظ شكلها المتعارف عليه المغزلي ونواتها الواضحة وسوطها الامامي وفجواتها الغذائية في نموذج السيطرة الشكل (24) مع التغير الواضح في الشكل العام للبروماستكوت المعامل بعقار الثاليدومايد منفرداً اذ تحول الى الشكل البيضوي عند تركيز 12.5 مايكروغرام/مل، الشكل (25).



الشكل (25) Promastigote اللشمانيا
الاحشائية *L. donovani* المعاملة
IC₅₀ بالثاليدومايد



الشكل (24) Promastigote اللشمانيا
الاحشائية *L. donovani* غير المعاملة
N: النواة، F: السوط، K الجسم الحركي



الشكل (28)
Promastigote اللشمانيا
L. donovani الاحشائية
المعاملة بالتازر IC₅₀
(بتثبت الثاليدومايد)



الشكل (27)
Promastigote اللشمانيا
L. donovani الاحشائية
المعاملة بالتازر IC₅₀
(بتثبت الامفوترسين ب)



الشكل (26)
Promastigote اللشمانيا
L. donovani الاحشائية
المعاملة IC₅₀
بالامفوترسين اللايبوسومي ب

لحظ عند البروماستكوت المعامل بالامفوترسين اللايوسومي ب عند تركيز 5 مايكروغرام/ مل تغير واضح في الشكل مع انتفاخ ملحوظ، تعدد للنوى ووجود عديد من الفجوات في الشكل (26). اما الشكلين (27) و(28) فيشيران الى حدوث انكماش واضح في الغشاء البلازمي فضلا عن حدوث انحلال وتشقق فيه وتحول البروماستكوت من الشكل المغزلي الى اشكال غير منتظمة وتتفق النتائج مع (Neto et al., 2011) اذ تم التوصل الى تأثير الياغامبين Yangambin المستحصل فيه من *Ocoteaduckei* على كل من بروماستكوت *L. amazonensis* و *L. chagasi* ومن خلال الفحص المجهرى لحظ تورم في جسم الخلية وفقدان حركة الطفيلي في الخلايا المعاملة جميعها. كذلك لحظ تورم وانتفاخ في المايكوكونديريا وانخفاض في كثافة السايكوبلازم ونضوح في الغشاء البلازمي وظهور النواة بشكل انبوبي وتضخم في منشأ الحركة عند تركيز IC_{50} . وأشار آخرون الى انه تم تحديد وملاحظة تغيرات في الشكل الخارجي والداخلي لبروماستكوت اللشمانيا من النواة، الجيب السوطي، المايكوكونديريا، الجسم القاعدي، الاجزاء الاحشائية مع ملاحظة وجود فقاعات في الجيب السوطي في بروماستكوت *L. amazonensis* عند تركيز IC_{50} وفي الطور اللوغارتمي (Silva-Lopez et al., 2007).

وتتفق مع دراسة (Al- Khan et al., 2006) حول تأثير الامفوترسين اللايوسومي ب على الشكل اذ تغير من المغزلي الى الدائري او غير المنتظم واصبح منتفخ وأشاروا الى وجود تغيرات في ازموزية الخلية مما سمح للسائل بالمرور في غشاء الخلية عن طريق الثغور وسبب انكماش وتحلل في العضيات الخلوية واختفائها. اما في حالة استخدام نباتي الدفلة والسبحيح *Nerium oleander* و *Melia azedarach* سوية. باستخدام تقنية تحديد نشاط الفوسفاتيز الحامضي وتركيز ايونات البوتاسيوم اذ اثبت ان نبات الدفلة يسبب زيادة في ايونات البوتاسيوم مما يؤدي الى تغيرات في نضوحية غشاء بروماستكوت اللشمانيا الجلدية والمعاملة بالمستخلصات المائية لنبات السبحيح تزداد الازموزية مسببة انتفاخ ملحوظ في الطور المسوط.

وأشار (Tavares et al., 2018) الى تأثير الكليوكينول على *L. infantum* و *L. amazonensis* والتغيرات التي احدثها في الشكل والتي تسببت في اختزال حجم البروماستكوت وفقدان السوط وغشاء المايكوكونديريا المحتمل وزيادة في انتاج ROS وتدفق السايكوبلازم في الغشاء البلازمي وتحطم غشاء المايكوكونديريا وبالتالي موت الطفيلي. ووجد ان تغير الضغط الازموزي لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية *L. tropica* يسبب انتفاخ الخلية ويرتبط بزيادة الحوامض الفوسفاتية وخروج ايونات K^+ وتغير الفعالية الفسلجية للانزيمات ومن ثم يصبح شكل البروماستكوت اصغر حجماً ويحدث ضموراً في السوط الحركي وقلة في الحركة (Al-Hayali et al., 2008). ولقد وجد

ان لعقار الامفوترسين اللايوسومي ب تأثير على نفاذية الغشاء بازالة الاستقطاب وزيادة نفاذ ومرور ايونات K^+ و Mg^{+2} وقد اثبت ان للامفوترسين اللايوسومي ب دور في الارتباط بالاركوستيرول للغشاء الخلوي وعدم الاستقرار التناضحي لايونات K^+ و Mg^{+2} وتشكيل فتحات تشبه المسام وقنوات ايونية وفقدان سلامة الغشاء باستجابة قوية للضغط الخلوي الازموزي واضطراب التمثيل الغذائي وبالنهاية موت الخلية وكذلك فان انتاج ROS يؤدي الى تراكمها ويسبب تضرر الخلايا المعرضة له ويسمى بالكرب التأكسدي والذي يكون متورطاً في موت الخلايا المبرمج المستحث (Shirzadi, 2019; Purkait *et al.*, 2012). ويفقد البروماستكوت المعامل بعقار الاورانوفين الشكل الطبيعي ويتحطم ويفقد السوط وتتكون فقاعات داخل الخلية مسببة تحطم البروماستكوت وتحول شكله الى دائري ويصبح شكل البروماستكوت غير منتظم. وتحدث المعاملة بالاورانوفين حامضية ظاهرة. وظهور الحامضية فضلاً عن الانحلال في الغشاء النووي والحبيبات الكروماتينية والكثافة المختلفة والحوصلات الملتزمة فضلاً عن وجود اغشية مزدوجة للحوصلات ومن ثم حدوث انكماش وموت للخلايا (El-Naga *et al.*, 2020). اما الطفيليات المعاملة بعقار الوبينا فاير/ رايتونا فاير فيصبح الغشاء بشكل تقعرات.

اما سبب مفعول عقار الثاليدومايد فيعزى الى تأثيره على الحمض النووي للخلية وبالتالي حدوث تغيرات واضحة في شكل الخلية البنوية الجديدة الظاهري وحصول تشوهات خارجية وداخلية للخلايا وبالتالي تحفيز عملية الموت المبرمج للخلايا وهو مثبط لتولد الاوعية الدموية في قرنيات القوارض مسببا لها العمى (Vargesson, 2015)

9.4 تحديد سمية الادوية المستخدمة Determination of Toxicity

1.9.4 تحديد الجرعة المميتة الوسطية LD_{50} لعقار الثاليدومايد في الجرذان البالغة البيضاء باستخدام طريقة الصعود والنزول وذلك عن طريق التجريب بالفم

بلغت الجرعة المميتة الوسطية LD_{50} للجرذان البيضاء البالغة بالتجريب بالفم 4870 ملغم/ كغم فاظهرت الجرذان المعاملة بالعقار علامات التسمم وقد كان مدى الجرعة المستخدمة مابين 2500 - 5000 ملغم/ كغم ومقدار الزيادة والنقصان للجرعة 500 ملغم/ كغم وعدد الجرذان المستخدمة 8 التي ظهرت عليها علامات التسمم بعد 4 - 6 ساعات وبنتيجة (xxxxoxoxo) يعني بقاء ثلاثة جرذان من مجموع 8 وشملت علامات التسمم خمول الحيوان، واغماض العينين، وتدلي الرأس، وترنح، ورقود، وانعزال بجانب القفص، وقلة الاكل والشرب وانعدامه.

جدول (35) الجرعة المميّنة الوسطية لعقار الثاليدومايد

القياسات	النتيجة
الجرعة المميّنة الوسطية	4870 ملغم/ كغم
مدى الجرعة	2500 – 5000 ملغم/ كغم
الجرعة الأولية	2500 ملغم/ كغم
الجرعة النهائية	4500 ملغم/ كغم
مقدار الزيادة والنقصان في الجرعة	500 ملغم/ كغم
عدد الجرّان المستخدمة	8
مدى ظهور علامات التسمم	4 – 6 ساعات
علامات التسمم	خمول، اغماض العينين، تدلي الرأس، الترنح، الرقود، الانعزال في جانب القفص، قلة وانعدام الأكل والشرب
X	موت الحيوان خلال 24 ساعة
O	بقاء الحيوان حيا خلال 24 ساعة

2.9.4 تحديد الجرعة الوسطية LD₅₀ لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في الجرذان البيضاء

البالغة باستخدام طريقة الصعود والنزول وذلك بالحقن بالخلب

بلغت الجرعة المميّنة الوسطية LD₅₀ لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب في الجرذان البيضاء بالحقن بالخلب 3322 ملغم/ كغم وقد كان مدى الجرعة المستخدمة 1500 – 3500 ملغم/ كغم ومقدار الزيادة والنقصان للجرعة 250 ملغم/ كغم، وعدد الجرذان المستخدمة 10 التي ظهرت عليها علامات التسمم بعد 4 – 6 ساعات وبنتيجة (xxxoxoxoxo) يعني بقاء اربع جرذان احياء من مجموع 10 وشملت علامات التسمم تدلي الرأس، والترنح (فقدان التوازن)، وفقدان القابلية على الأكل، وخمول، واغماض العينين، وعدم القدرة على الحركة والانعزال نتيجة لتسمم بالدواء.

جدول (36) الجرعة المميتة الوسطية لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب

القياسات	النتيجة
الجرعة المميتة الوسطية	3322 ملغم/ كغم
مدى الجرعة	1500 – 3500 ملغم/ كغم
الجرعة الأولية	1500 ملغم/ كغم
الجرعة النهائية	3500 ملغم/ كغم
مقدار الزيادة والنقصان في الجرعة	250 ملغم/ كغم
عدد الجرذان المستخدمة	10
مدى ظهور علامات التسمم	4 – 6 ساعات
علامات التسمم	تدلي الرأس، الترنح، فقدان القابلية على الاكل، خمول، اغماض العينين، عدم القدرة على الحركة والانعزال
X	موت الحيوان خلال 24 ساعة
O	بقاء الحيوان حياً خلال 24 ساعة

3.9.4 تحديد الجرعة المميتة الوسطية LD₅₀ للتأزر بين العقارين في الجرذان البالغة البيضاء

حددت الجرعة المميتة للعقارين سوية بالتجريب بالفم لعقار الثاليدومايد والحقن بالخلب لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب معاً باستخدام طريقة الصعود والنزول. اذ بلغت الجرعة لعقار الثاليدومايد 3274 ملغم/ كغم بالفم و1887 ملغم/ كغم لعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب وقد كان مدى الجرعة 1500 – 3000 و750 – 1500 ملغم/ كغم للعقارين على التوالي ومقدار الزيادة والنقصان 500 و250 ملغم/ كغم للعقارين على التوالي ومدة ظهور علامات التسمم بعد 4 – 6 ساعات وقد استخدم 10 جرذان للتجربة وكانت النتيجة موت 6 منها.

اتضح من النتائج السابقة للسمية ان القيمة السامة لعقار الثاليدومايد كانت 4870 ملغم/ كغم ولعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب 3322 ملغم/ كغم كل لوحدة وفيما يتعلق بالتأزر بين العقارين كانت للثاليدومايد 3274 ملغم/ كغم ولعقار الامفوترسين اللايبوسومي ب 1887 ملغم/ كغم.

جدول (37) الجرعة المميتة الوسطية للتأزر بين العقارين الثاليدومايد والامفوترسين
اللايوسومي ب

القياسات	الثاليدومايد	الامفوترسين اللايوسومي ب
الجرعة المميتة الوسطية للعقار الاول وللعقار الثاني	3274 ملغم/كغم	1887 ملغم/كغم
مدى الجرعة	1500-3000 ملغم/كغم	750-1500 ملغم/كغم
الجرعة الاولى	1000 ملغم/كغم	500 ملغم/كغم
الجرعة النهائية	2500 ملغم/كغم	1500 ملغم/كغم
مقدار الزيادة والنقصان جرعة	500 ملغم/كغم	250 ملغم/كغم
عدد الجرذان المستخدمة	10	10
مدى ظهور علامات التسمم	4-6 ساعات	4-6 ساعات
علامات التسمم	بطء الحركة، تنرج وانعدام الاكل	النوم، اغماض العينين والانعزال

X- موت الحيوان في 24 ساعة O- بقاء الحيوان حياً في 24 ساعة

$$LD_{50} = xf + kd$$

الجرعة المميتة الوسطية = LD_{50}

Xf = اخر جرعة مستخدمة في التجربة

K = القيمة الجدولية

D = مقدار الزيادة والنقصان في الجرعة المعطاة

A = الجرعة المميتة الوسطية للثاليدومايد لوحده

$$LD_{50} = 4500 + 0.74 \times 500$$

$$= 4500 + 370.5$$

$$= 4870 \text{ mg/kg}$$

B = الجرعة المميتة الوسطية للامفوترسين اللايوسومي ب لوحده

$$LD_{50} = 3000 + 1.288 \times 250$$

$$= 3000 + 322$$

$$= 3322 \text{ mg/kg}$$

C = الجرعة المميتة الوسطية للتأزر بين العقارين

العقار الأول $LD_{50} = 2500 + 1.549 \times 500$

$$= 2500 + 774.5$$

$$= 3274 \text{ mg/kg}$$

$LD_{50} = 1500 + 1.5495 \times 250$

$$= 1500 + 387.25$$

العقار الثاني

$$= 1887 \text{ mg/kg}$$

ويمكن ان تكون حساب الجرعة المميتة للتأزر بين العقارين ضمن المعادلة الآتية

$$LD_{50} = (2500 + 1.549 \times 500) + (1500 + 1.549 \times 500)$$

$$= (2500 + 774.5) + (1500 + 387.25)$$

$$= (3274) + (1887)$$

للـعقار الاول

للـعقار الثاني

اتضح مما تقدم ان للتأثير التآزري للعقارين معاً بالتراكيز المذكور أنفاً تأثير فعال جداً على الجرذان وعمل التأزر على خفض تركيز العقارين مما قد يقلل من كمية السمية والاثار الجانبية للمركبين. وان قيمة السمية للعقارين سوية قد انخفضت بمقدار كبير عما هو عليه فيما لو كان كل عقار بمفرده فضلاً عن زيادة الاعراض من قبيل بطئ الحركة، الترنح، قلة الاكل، النوم، اغماض العينين والانعزال في طرف القفص وهذا يتفق مع ما جاء به بعض الباحثين حول ميكانيكية عمل الثاليدومايد وسميته وفي الفئران من انه يسبب النوم، وانخفاض في التنفس، وفقدان في التوازن وخدرًا في الأطراف (Hirose et al., 2020).

وقد أكد (Teo et al., 1999) ان استعمال الجرعة الفموية للثاليدومايد يجب أن تكون أكثر من 3000 ملغم/كغم/يومياً لمدة تزيد عن 13 اسبوعاً لكي يظهر التأثير السام المسبب لتضخم الكبد والمسبب لنقص الوزن ويلحظ عدم التطور الوظيفي للأعصاب المرتبطة بالذراع والجلد الشوكي، فقر الدم، نقص T4، انخفاض في حجم الغدة الدرقية Thymus.

وأشار (Teo et al., 2001) الى ان إعطاء عدة جرعات من الثاليدومايد تقدر بـ 43، 200، 1000 ملغم/كغم/يومياً لمدة 53 اسبوعاً لم تظهر أية سمية جهازية.

لثاليدومايد شكلين ايزوميرين مختلفين S- و R+ ال (+) مع اتجاه عقارب الساعة وال (-) عكس اتجاه عقارب الساعة (R+) مما يعد امناً للبشر ويساعد في الاستجابة للالتهابات و(S-) يسهم في سمية الثاليدومايد (TNF- α) عامل نخر الورم الفا الذي يساعد في تنظيم نمو الخلايا المبرمج اذ يؤدي الخلل الى اطلاق عامل نخر الورم الى اثار ضارة (Tantibanchachai and Yang, 2014). وظهرت بعض الدراسات بان R-Thalidomid يستخدم معدلاً مناعياً ومضاداً للالتهابات بينما S-Thalidomide فهو مثبط للجهاز العصبي المركزي في الجرذان بجرعة أقل مرتين من الجرعات المطلوبة بعدد 2-4 ساعة (Lee et al., 2011).

وفيما يتعلق بسمية عقار الامفوترسين اللايوسومي ب فقد بين (Ibrahim et al., 2003) ان استخدامه مقارنة مع AMB deoxycholate على نموذج فئران معاملة بالسكري وبفطر *Rhizopus oryzae* عند حقنها بـ 7.5 ملغم/ كغم من وزن الجسم مرتين يومياً من L. Amph-B تحسن حالتها مقارنة مع حقن نماذج أخرى في الفئران المصابة بـ 0.5 ملغم/ كغم من الـ AMB إذ لاحظ ان التركيز العالي كان أكثر كفاءة لعلاج الفئران المصابة واقل سمية ولاحظ ان الشكل الشحمي L. Amph-B هو اقل سمية للكلية من Amb ويمكن أن يعطى بجرعة عالية وقد يُعد علاجاً سريرياً نظراً لتناقص مستوى سميته مقارنة مع Amb المسبب للسمية الكلوية والتأثيرات الضارة الأخرى. إذ يمكن اعطاء L. Amph-B بمعدل 15 مرة أكثر من Amb وبسمية قليلة جداً.

وقد تعود قلة سمية الامفوترسين اللايوسومي ب في الكلية الى الانتشار المميز للجسيم الشحمي في الاعضاء الغنية بخلايا الشبكية المبطنة او نظام البطانة الشبكية من (الكبد والرئة والطحال) والذي يعمل على اختزال تركيز العلاج من البلازما وتنظيف الكلية فضلاً عن انحلال الامفوترسين ب وتحريره على مستوى الخلية لعدم وجود اللايبيز والفوسفولايبيز في الخلايا الكبيبية للكلية او الخلايا المبطنة للانبوب الكلوي (Quimioter, 2012).

وأشار آخرون الى ان الامفوترسين اللايوسومي ب اشد سمية وله معدل وفيات في اناث الفئران مع اختلاف الجرعة المعطاة وللإناث معدل انتشار للعقار في الكبد والكلية أعلى من الذكور لأن لدى الإناث تعرض اعلى للعقاقير، عمر نصف أطول وتصفية للبلازما اقل مقارنة بالذكور (Wang et al., 2021).

واكد آخرون أن AMB بتركيز اكبر من 0.5 – 1.0 ملغم فعال لدى الفئران ضد الفطريات ووجد ان تأثير AMB المحمل بـ PEGylatd polylactic-polyglycolic acid copolymer (PLGA-PEGN) ضد *Candida albicans* يقلل 2-3 مرات عن تركيزه مقارنة بـ AMB الحر ولذا تم التوصل الى أن تحضير AMB-nanoparticles (NPs) بهذا الشكل له قيمة علاجية عالية وكفاءة ممتازة ونتائج مرضية لعلاج الاصابات الفطرية التي تتضمن

الـ *Candida Spp.* (Belkherroubi-Sari *et al.*, 2011). فضلا عن تقليل الاثار الجانبية ومنها سمية الكلى وتحلل الدم ووجود بـأن (PLGA-PEG) في AMB يحسن الامتصاص لـ AMB في الخلايا ويحسن الفعالية ضد الفطريات ولاسيما في انسجة الكلى (Radwan *et al.*, 2017). كذلك وجد ان الامفوترسين اللايوسومي ب يكون ذا سمية عالية خارج الجسم الحي ولكن لم تثبت سميته داخل الجسم الحي اذ لم يؤثر على الخلايا عند تركيز 1000 مايكروغرام/ مل لمدة 5 ساعات ولكن تم قتل الخلايا جميعها خارج الجسم عند تركيز اقل من 100 مايكروغرام/ مل (Roberts *et al.*, 2015). وقد لاحظ (Tamiru *et al.*, 2016) ان استخدم جرعة عالية من الامفوترسين اللايوسومي للمرضى المصابين بالعوز المناعي HIV والاشمانيا الاحشائية تحتاج الى عناية فائقة في اثناء التسريب الوريدي للحصول على كفاءة عالية في العلاج مع مراقبة مستوى البوتاسيوم في الدم في فترة العلاج السريري. وقد اتفق عدد من الباحثين على ان الامفوترسين اللايوسومي ب يمكن ان يستعمل كقطرة للعين في الارنب بواقع 0.15% و 0.5% كل ساعة لمدة ثلاثة ايام. ودرس تأثيره على انسجة العين (القرنية، العدسة، القرنية، السائل الزجاجي والشبكية) ووجد انه ليس لديه سمية عليها (Amalia *et al.*, 2020).

ان الثاليدومايد في حالة تأزره مع عقارات أخرى يظهر فاعلية عالية عند الجرعات المنخفضة فضلا عن السمية المنخفضة والتي يمكن التحكم فيها نسبياً (Sherbet, 2015) وتقلل عملية دمج عقار الثاليدومايد بالديكساميثازون من معدل الإصابة بالنسبة لمرضى المايلوما فبعد ان كانت (50% - 70%) وصلت بعد العلاج الى (25% - 40%) وان تقليل الجرعة للعلاجين كليهما يكون أقل سمية وأعلى استجابة وهذه الحالة تفيد الاشخاص الذين يعانون من سمية عالية للعقار لوحده. (Palladini *et al.*, 2005).

وقد اكد آخرون ان العلاج المركب من L. Amph-B و Caspofungi (CAS) اظهر نتائج غير متوقعة بعدم وجود أية اثار جانبية او سامة في حين ان 4 من مجموع 48 مريضاً يصابون بنقص البوتاسيوم في الدم ولهذا يجب وقف التسريب الوريدي له وان 3 من 48 مريضاً يصابون بالحرارة لوجود عقار CAS وقد يصابون بالاختلال الوظيفي الكبدي (Kontoyiannis *et al.*, 2003). وقد لاحظ (Vechi *et al.*, 2020) ان العلاجات المضادة للاشمانيا تكون حرة وتسبب اثار سلبية خطيرة ولكن يعطي تقليص جرع العلاجات المركبة نتائج افضل من العلاجات المفردة. مما لا يتفق مع رأي بعض الباحثين حول أن بعض العلاجات المركبة ذات اثار سلبية ولا يمكن تجاهل سميتها مثل AmB و Pentamidine يمكن جميعها ان تسبب امراض الدم والكلى او الاعتلال القلبي غير الطبيعي (Alvar *et al.*, 2012).

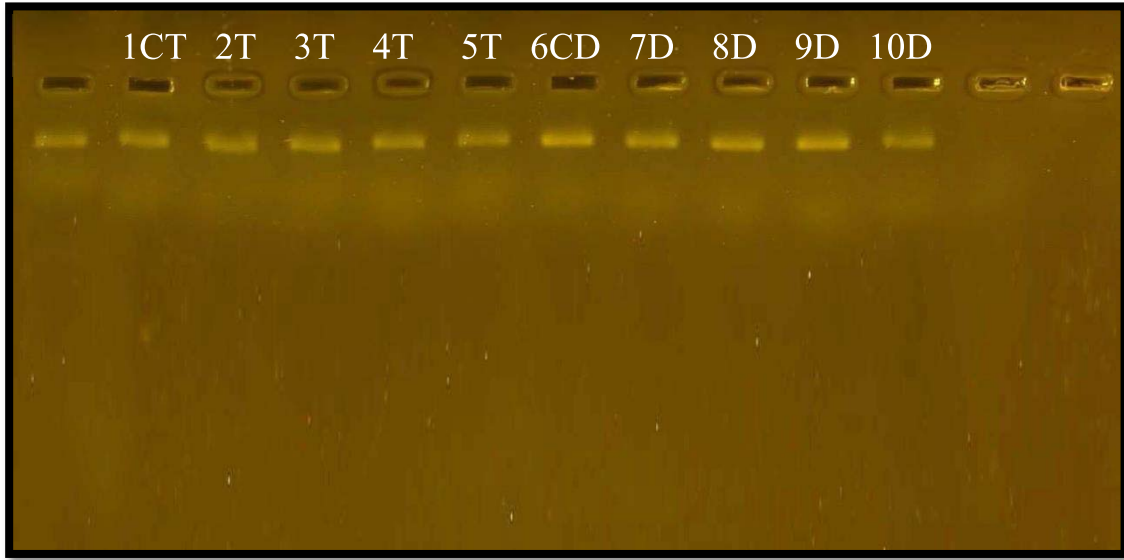
ومما تجدر الإشارة إليه ان التأزر بي L. Amph-B و Colistin (CST) في الدراسات التي أجريت على الفئران المعاملة بـ *Candida. albicans* اثبتت فعاليته وان الفئران استجابت للعقار المشترك (Teixeira-santos et al., 2016).

وفي ضوء كل ما تقدم من معلومات اعطينا هذه الدراسة نظرة اولية Basic للبدء بدراسة جزيئية في التأثير على المستوى المورثي لهذه الطفيليات التي قد تقود الى تطور جديد يمكن استخدامه كمضاد للشمانيا مستقبلاً

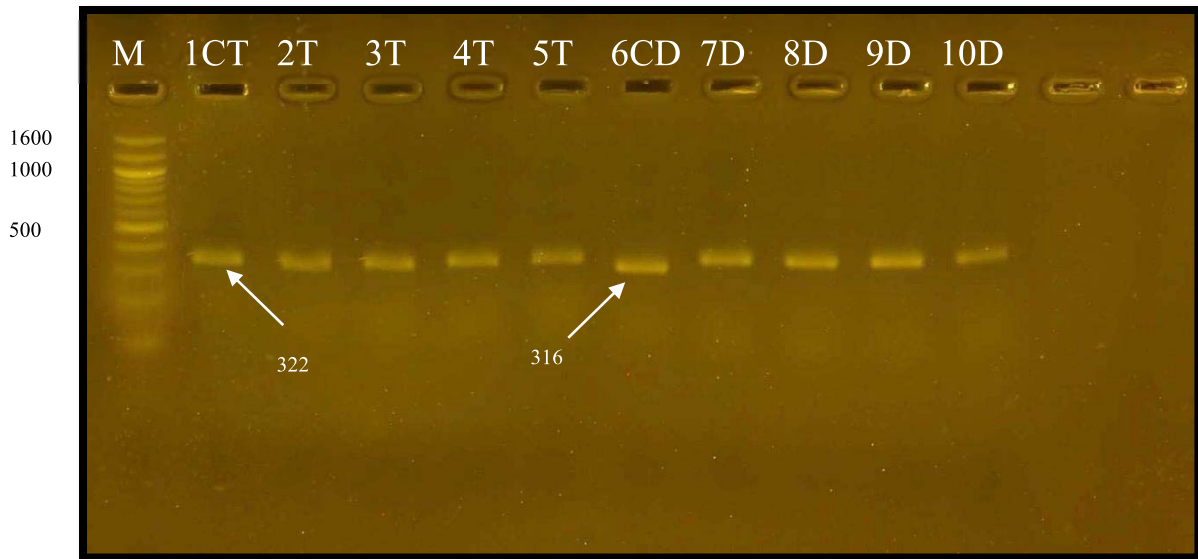
10.4 تأثير عقار الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب والتأزر بينهما في السلسلة الداخلية المستنسخة *ITS1* لبروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية.

Effect of Thalidomide and Liposomal Amphotericin B and Synergistic of them on *ITS1* for *L. tropica* and *L. donovani* promastigote.

اظهرت نتائج الاختبارات الجزيئية لسلسلة *ITS1* عدم وجود تباين وراثي في مورثات السلسلة المدروسة اذ اظهرت الحزم لـ (10) نماذج تطابقاً لما تم دراسته اذ ان الحزم من (1-5) ظهرت عند 322 bp والمطابقة لسلسلة الشمانيا الجلدية، والحزم من (6-10) ظهرت عند 316 bp وهي مطابقة لسلسلة الشمانيا الاحشائية وتشمل النماذج العشرة للشمانيا المعاملة بالادوية وغير المعاملة وفي الشكل (30) المبين تظهر الحزم بشكل سلسلة متشابهة الاحجام لكنها تختلف اختلافا بسيط لا يظهر بوضوح بتصوير الحزم وقد تم مطابقة هذه التسلسلات الخاصة بالمورثات مع تسلسلات المورثات الموثقة في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية (NCBI) وتم تحليل النتائج بالاعتماد على برنامج (BLAST) لذا تم التأكد من العينات المتعامل معها جزيئياً.



الشكل (29): استخلاص الحمض النووي DNA من عينات طفيلي اللشمانيا



الشكل (30): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم سلسلة *ITS1* لطفيلي اللشمانيا ونواتج تفاعل

L. donovani في 316 و *L. tropica* في 322 bp

M: الدليل الحجمي

لقد اكد (Rezaei et al., 2020) عند تشخيص *ITS1* بتقنية البلمرة PCR لاشخاص ليس لديهم اعراض لداء اللشمانيا فقط تورم في البطن ولم تشخص حالتهم مسبقا وبسبب ضغط الجهاز المناعي للمضيف الذي يمنع الطفيلي من التمايز وبقائه في حالة غير ممرضة فتم التعرف على اللشمانيا وتمييز نوعها.

واتفقت النتائج مع ما جاء به (Hide *et al.*, 2013) في دراسة بفرنسا التي أظهرت تنوعاً مورثاً ضعيفاً جداً لعزلات اللشمانيا في الحالات التي ليس لديهم اعراض، فعند اجراء اختبار *ITS1* تم التأكد من اصابتهم باللشمانيا عند مقارنتها مع العزلات التي يصاحبها اعراض. وقد اكد آخرون على ان استخدام تقنية الـ *PCR-ITS1* مهمة جداً وضرورية للتمييز بين أنواع اللشمانيا، فقد تم استخدام طريقة الفحص المايكروسكوبي وباستخدام صبغة كيمزا سلايد لما يقرب من 3861 حالة في المناطق الريفية قرب افغانستان واخيراً تم استخدام تحليل تفاعل البوليميريز المتسلسل *ITS1-PCR-RFLP* اذ تم كشف هيمنة *L. tropica* لأكثر من 98% من النماذج لـ 127 عينة تم اختيارها عشوائياً وبتقنية *ITS1-PCR-RFLP* وتم كشف اربع سلاسل لأنواع من بين 21 لـ *L. tropica*. (Fakhar *et al.*, 2016).

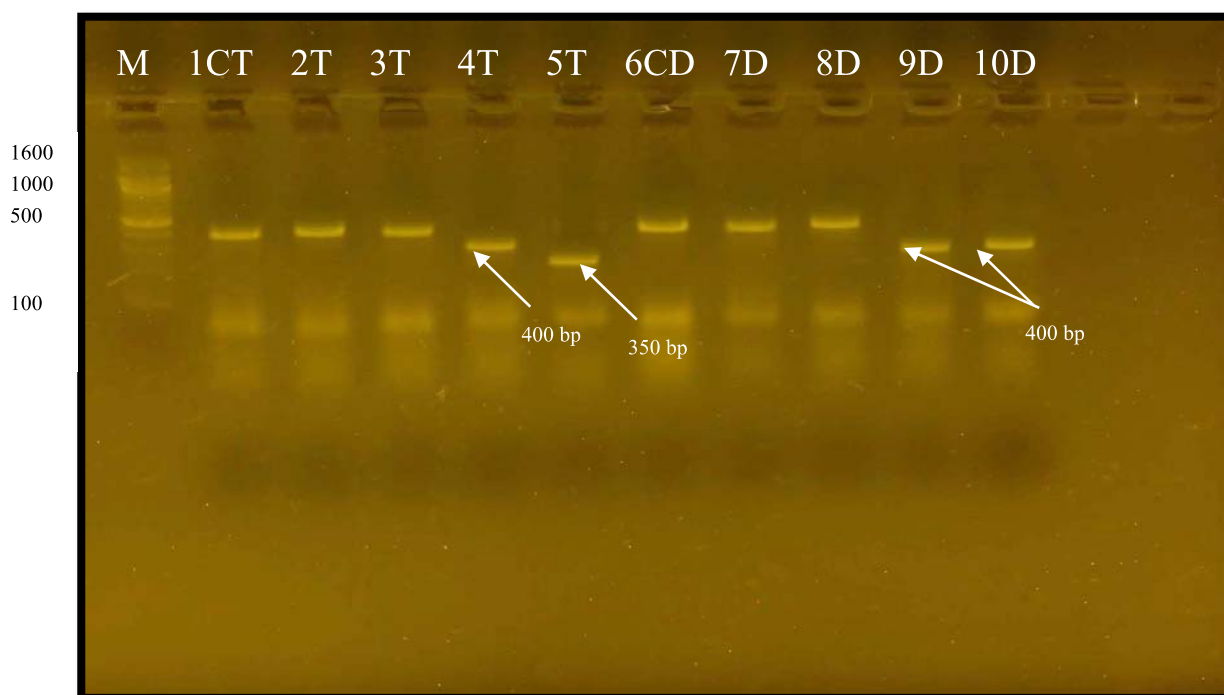
وشخصت اللشمانيا في جنوب شرق ايران بالطريقة نفسها *ITS1-PCR-RFLP* وتم تحديد 24 من أصل 33 مريضاً منها 21 عزلة لديها 350 نطاقاً قوياً (87.5%) وثلاث عزلات بها 450 نطاق قوياً وتم كشف اللشمانيا الحيوانية *Zoonotic Cutaneous Leishmania* في 19 حالة (Mansour *et al.*, 2016).

لقد اشار (Ceccarelli *et al.*, 2020) الى ان اللشمانيا المنتشرة والمتوطنة في امريكا اللاتينية وجدت بأنواع عديدة مما يبرز العديد من الاختبارات للتفريق بينهم مثل *L. amazonensis* و *L. infantum*. وتم استخدام مقاييسات مصممة لتضخيم دائرة (qPCR- ML- qPCR- ama) الصغيرة للفئات الفرعية والمتمثلة بـ *KDNA* ومتبوعاً بتحليل *qPCR-ITS1* وقد تم انشاء خوارزمية *ITS1* متبوعاً بتحليل الادارة للموارد البشرية للتفريق بين *L. mexicana* و *L. amazonensis* و *L. infantum*. وقد عملت على تحديث توسيع البيانات وتوفير اداة تشخيصية اضافية للمناطق الموبوءة في الانواع الموجودة معاً. واكد آخرون على انه حددت انواع اللشمانيا بالانزيمات او الطرائق البايولوجية الجزيئية، وقد تم تصنيف بروتينات اللشمانيا المعزولة من مورثات المرضى باستخدام تسلسل *ITS1-PCR-RFLP* الحمض النووي باستعمال بادئات خاصة. واستخدم اللشمانيا القياسية لهدف تحليل وحدة تكرار *ITS1* التشخيصي (Eksi *et al.*, 2017). ووجد في البرازيل انواع من اللشمانيا التي تصيب الحيوانات وتم استخلاص الـ *DNA* لـ 100 نموذج من الجمال واستخدمت البادئات الخاصة لـ (*TIS1*) للكشف عن وجود اللشمانيا وقد لاحظ وجود 300-350 قاعدة نترجينية في بنك الموروثات وكانت مطابقة 100% لـ *L. infantum* (314 bp) وأوضحت هذه النتيجة ان الجمال أيضاً تصاب باللشمانيا (Vioti *et al.*, 2019).

11.4 تأثير عقار الثاليدومايد والامفوترسين الالايوسومي ب والتأزر بينهما في مورث *KMP11* لبروماستكوت اللشمانيا الجلدية والاحشائية.

Effect of thalidomide and liposomal amphotericin B and synergistic of them on *KMP11 L. tropica* and *L. donovani Promastigote*

اظهرت النتائج وجود تباين وراثي. اذ بين الشكل (31) ان المورث اظهر حزماً بحجم 470 bp في البروماستكوت لـ 10 نماذج من اللشمانيا المعاملة وغير المعاملة وقد كانت العينات من (1 - 5) تابعة للشمانيا الجلدية *L. tropica* ومن (6 - 10) تعود للشمانيا الاحشائية *L. donovani* ولحظ تغير في حجم الحزم اذ ظهرت العينة رقم 4 بحجم حزمة 400 bp التي تعود الى اللشمانيا الجلدية والمعاملة بالعقارين سوية وبتركيز 0.5 مايكروغرام/ مل للثاليدومايد ببتثيت الـ L. Amph-B عند 2.5 مايكروغرام/ مل وظهرت العينة رقم 5 بحجم 350 bp والتي تعود الى اللشمانيا الجلدية والمعاملة بالعقارين سوية وبتركيز 2 مايكروغرام/ مل ببتثيت الثاليدومايد عند 2.5 مايكروغرام/ مل فضلاً عن ظهور العينة رقم 9 و 10 والتابعة للشمانيا الاحشائية التي تعود للتأثير التأزري للعقارين بحجم حزمة 400 bp.



الشكل (31): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم مورث *KMP11* لطفيلى اللشمانيا بحجم 470 bp

M: الدليل الحجمي

اشارت هذه النتائج أن ظهور هذه الحزم المغايرة يدل على حدوث بعض التباينات الوراثية التي حصلت في هذا المورث مقارنة مع مجموعة السيطرة لكل عينة وحصلت هذه التغيرات في المورثات المعاملة عند التازر بين العقارين مما اتفق مع ما جاء به (Soflaei et al., 2012) الذي أشار الى طول حزمة المورث وتعبير هذا المورث وتسلسله في أنواع طفيليات اللشمانيا.

وفيما يتعلق بدراسة تغيير تسلسل المورث في طفيلي اللشمانيا يعتبر الـ *KMP11* Kinetoplastid-11 بروتين الغشاء في جميع البروتوزوا الحركية وهو مرشحاً محتملاً للقاح لداء اللشمانيا نوع *L. amazonensis* في الطورين *amastigote* و *pramastigote* ووجود هذا البروتين بالاقتران مع الهياكل الغشائية على سطح الخلية، الجيب السوطي، الاسواط، الحويصلات وداخل الخلايا (Coutinho et al., 2015).

وأشار آخرون الى ان طفيلي اللشمانيا يثبط الاندماج اللايزوزومي مع البلعم ويقاوم عملية البلعمة وترتبط الحامضية بعملية البلعمة أي الارتباط بين *KMP11*-Ergosterol يحدث في الـ PH الواطئة وينخفض ارتباط الـ *KMP11* بجدار الخلية الملتزمة شكلاً كبيراً عند الحامضية المنخفضة مما يسهل بقاء طفيلي اللشمانيا داخل خلايا المضيف (Sannigrahi et al., 2019).

وقد اتفق باحثون آخرون على أهمية مورث الـ *KMP11* فقد ثبت انه يمتلك ثلاث صفات مناعية واضحة مثل تحفيز انتاج الخلايا اللمفية والاستجابة للسمية الخلوية وتوفير الحماية المناعية للأنماط الحيوانية. وتشير الأدلة كلها الى ان هذا المورث هو هدف ممتاز للعلاج المناعي والتحصين ضد اللشمانيا (Dalimi and Nasiri, 2020).

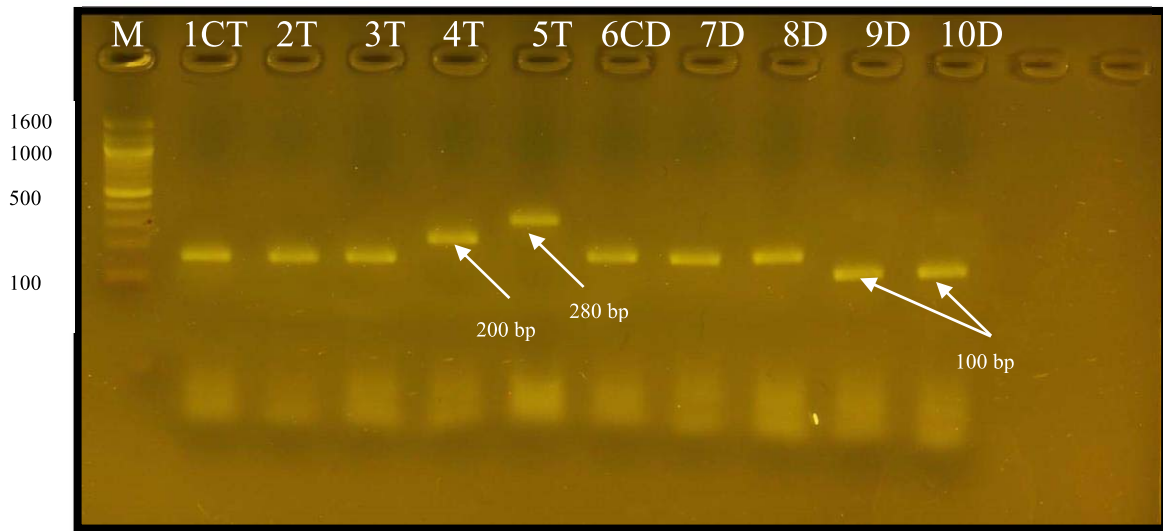
وفي دراسة لـ (Sannigrahi et al., 2017) بين أن *KMP11* غني بالحامض الاميني التربتوفان الذي يوجد بالقرب من الاسطح الدهنية المحبة للماء وأن حدوث أية طفرة او خلل في هذا البروتين يؤدي الى اتجاه التربتوفان عميقاً نحو مركز البروتين او قد يتحلل جزئياً او كلياً ومن ثم تتغير خصائص الغشاء البلازمي. وبين آخرون ان حدوث أي طفرة في بعض مواقع المورثات تؤدي الى حدوث تغيرات في بنية شكل البروتين وثباته (Bandani et al., 2014).

لقد اوضح (Mortazavidehkordi et al., 2018) ان Hydrophilic Acylated Surface Protein B (HASP) وهو بروتين مناعي خاص باللشمانيا، يتم انتاج الاجسام المضادة ضده في امصال الافراد المصابين باللشمانيا ويعد *KMP11* بروتين الغشاء المرشح المناسب لتطوير اللقاح ضد اللشمانيا فقد تم استنتاج ان *HASP* و *KMP11* في العامل الناقل PCDH-CGFP والمدمج بالبروتين قد شكل لقاح مضاد لـ DNA الـ *L. major* بالحقن في الجرذان والفئران ولحظ ان مستوى IFN- γ IgG2 أعلى من IL-10, IgG1 ولحظ ازدياد نشاط الـ TH1 للخلايا الملتزمة وزيادة مناعة الخلية. فضلا عن تجمع الطفيلي في داخل الكبد والطحال والعقد اللمفية للجرذان والفئران أقل من نموذج السيطرة.

12.4 تأثير عقار الثاليدومايد والامفوترسين اللايبوسومي ب والتأزر بينهما في بروماستكوت الشمانيا الجلدية والاحشائية على مورث *ND1*.

Effect of thalidomide and Liposomal Amphotericin B and Synergistic of them on *ND1* Gene for *L. tropica* and *L. donovani* promastigote

اشارت النتائج الى ظهور تباين وراثي في بعض المركبات قيد الدراسة اذ بين الشكل (32) ان المورث اظهر حزم بحجم 113 bp في طور الشمانيا المعاملة وغير المعاملة لكل من *L. tropica* و *L. donovani* اذ ظهر التباير في العينة 4 بحجم 200 bp والعينة 5 بحجم 280 bp لطيفلي *L. tropica* والعينتين 9 و10 بحجم 100 bp وتبين التباير الوراثي في الشمانيا المعاملة بالعلاج المركب بشكل واضح مقارنة مع نماذج السيطرة.



الشكل (32): الترحيل الكهربائي لنواتج ضخيم مورث *ND1* لطيفلي الشمانيا بحجم 113 bp

M: الدليل الحجمي

يُعد مورث *ND1* من مورثات الترميز للميتوكوندريا ولـ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen (NADH) الوحدة الثانوية للديهايدروجينز الذي يقع في الغشاء الداخلي للميتوكوندريا وهو الأكبر لخمس معقدات في سلاسل نقل الالكترونات. *ND1* ويُعد المورث المجهز لصنع بروتين يسمى NADH وهذا البروتين جزء من انزيم مقعد وكبير فعال في الميتوكوندريا التي تقوم بتحويل الغذاء في الخلية الى طاقة لعملية تسمى الفسفرة المؤكسدة Oxidative phosphorylation والتي تستخدم الاوكسجين والسكر البسيط وتحوله الى

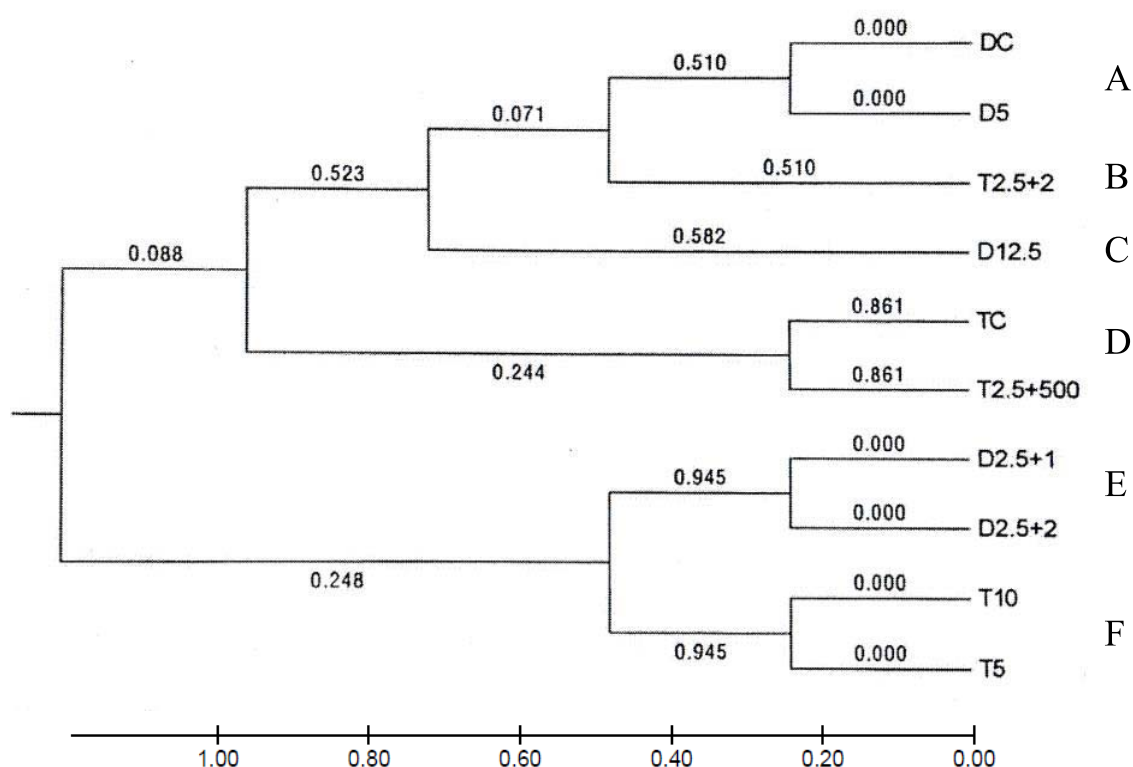
Adenosine Triphosphate (ATP)، يُعد *ND1* و *CO* و ATPase مورثات الترميز للوحدة الثانوية NADH Ubiquinone oxidoreductase. (Taanman, 1999)

اتفق بعض العلماء على أن الفهم السليم للطفيليات هو المفتاح لتحديد الأهداف الدوائية لها فقد حددت العديد منها في مائتوكونديريا المثقبيات *KDNA*, *topoisomerases* (سلسلة نقل الإلكترون واستعمال الحمض النووي الريبوزي الناقل وتخليق الأحماض الدهنية) فقد استخدم أدوية عديدة معتمدة مثل البنيتامدين والنيفورتيموكس والأتيميسينين لتنشيط أهداف معينة تحفز الموت المبرمج وتضعف إمكانية غشاء المائتوكونديريا أو إنتاج أنواع الاوكسجين التفاعلية وسيظل هذا التحليل الظاهري لمائتوكونديريا المثقبيات أداة مفيدة لتصميم مركبات نشطة جديدة ذات سمية انتقائية ضد هذه الطفيليات (Fidalgo and Gille, 2011). ووجد أن المائتوكونديريا وما تحتويه من مورثات هدف جيد واستثنائي في العلاج الكيميائي ف لوحظ أن الاكيرسيتين يمارس تأثيره المضاد السام على *L. amazonensis* بتوليد ROS والتأثير في وظيفة المائتوكونديريا الطفيلية مسببا موت الخلية عن طريق زيادة نفاذية البروتونات بغشاء المائتوكونديريا الداخلي مما يقلل من تخليق الـ ATP مع زيادة الكيرسيتين ويقلل من $\Delta\psi$ وموت الطفيلي (Fonseca-Silva et al., 2011). وقد بين (Cermakova et al., 2021) أن المعقد (NADH dehydrogenase) يعد أول انزيم بالسلسلة التنفسية فهو يحفز انتقال الإلكترونات من NADH إلى Ubiquinone الذي يرتبط بمضخة البروتونات خارج المادة الأساس. كما تعد *ND1-ND5* من الوحدات الثانوية في DNA المائتوكونديريا فهي مهمة في هيكليّة المائتوكونديريا وتشارك في ضخ البروتونات والارتباط بالـ Ubiquinone, Rotenone لأنواع المثقبيات *Trypanosoma spp* بحسب ما أشار إليه (Grba and Hirst, 2020; Kampjut and Sazanov, 2020) أن اقتران نقل زوج من الإلكترونات من NADH إلى Ubiquinone مع نقل أربع بروتونات بالغشاء الداخلي للمائتوكونديريا يقترح تشكيل تغيرات بالتداخلات الكهربائية وجزيئات الماء التي تشكل مسار البروتونات المتنقلة ويؤدي الـ Hydrophobic p-module الذي يتكون من *ND1*, *ND2*, *ND4*, و *ND5* دورا في مضخة الإلكترونات داخل الغشاء الداخلي للمائتوكونديريا. وقد أوضح (Ortiz et al., 2016) أن سايتوكروم المائتوكونديريا bc1 يؤدي دورا كبيرا في نقل سلسلة من الإلكترونات والتي تعد هدف دوائي مهم مثل استعمال Endochin-like quinolones (ELQs) الذي درس تأثيره السمي على الأمستوكوت لكل من *L. donovani* و *L. mexicana* مستهدفا سايتوكروم bc1 وقد أكد (Brindha et al., 2021) أن المائتوكونديريا عضو بغاية الأهمية في الخلية ولاسيما في عملية الأكسدة الغذائية، تحرير الطاقة، الأكسدة والاختزال الخلوية، توازن الكالسيوم في الخلية الحية والموت الخلوي، إذ تنتج بيروكسيد الهيدروجين في الأنواع المؤكسدة الرئيسية في أثناء إرسال الإشارات لخلوية

في الساييتوسول وانحلال الماييتوكونديريا لزيادة في السمية التي تؤدي الى موت الخلية، وان DNA الماييتوكونديريا تحوي على 30% من المورثات تجعلها هدفا دوائيا ممتازا.

13.4 النمط الظاهري الشجري The Tree Phenotype

توضح الشجرة تركيزين معنقين ضمن المجموعة A و E و F بنسبة تشابه 0.000 وتركيزين معنقين ضمن المجموعة D بنسبة 0.861 وتركيز واحد معنقد عند المجموعة B و C. وقد اظهرت المجموعة A تباعد عن B بنسبة 0.510 و B عن C بنسبة 0.582 و A عن B بنسبة 0.582 و C بنسبة 0.071 ونسبة تباعد D عن C 0.244 وعن A و B و C 0.523 اما نسبة تشابه E و F فهي 0.945 وفيما يتعلق بنسبة تباعد E و F عن D فهي 0.248 في حين نسبة تباعدها عن A و B و C و D فهي 0.088.



الشكل (33) العلاقة بين سلالات الشمانيا الجلدية والاحشائية *donovani* و *L. torpica* ضمن المخطط الشجري اعتماداً على السلسلة *ITS1* باستعمال طريقة UPGMA ضمن برنامج Mega.6 وتأثير الادوية بتراكيز مختلفة على السلسلة الداخلية لمستنسخة *ITS1*

يوضح هذا الشكل سيادة الانماط التي سجلت في الموقع العالمي NCB1 ضمن الارقام التسلسلية الموضحة التي أظهرت سلاسل وراثية جديدة سجلت بالأحرف المبينة بالجدول التالي:

Internal transcribed spacer Partial – Nucleotid – NCBI

Leishmania tropica DNA

الرمز	التسلسل في البنك الدولي للمورثات	التركيز مايكروغرام/مل
Nes-H1	LC650026.1	T10
Nes-H2	LC650027.1	T5
Nes-H3	LC650028.1	T2.5+500

وفي استخدام تقنية الـ PCR واستخدام فحص *ITS1* تم التشخيص الدقيق لطيفلي الشمانيا وذلك بملاحظة التأثيرات الدوائية ومدى التقارب والتشابه مع السلالة غير المعاملة للنوعين كليهما من الشمانيا فضلا عن مدى التغيرات في الانماط الجينية بحسب النتائج التي ظهرت لدينا ضمن سلسلة *ITS1* وهي من التقنيات الدقيقة جداً في ملاحظة مدى التغير في الاليلات المزروجة وملاحظة حدوث الطفرات بتأثير الادوية وهذا يتفق ما جاء به (Lata et al., 2021) عند عزله لسلالتين من *L. donovani* من معي ذبابة الرمل التي كانت مشابهة بنسبة 97% لسلالة الشمانيا *L. donovani* التي قد سجلت ضمن الشمانيا الجلدية في Himachal Pradesh مع ارقام الانضمام لها MT423519-21 وتعد هذه الطريقة ذات أهمية وبائية للتخطيط الاستراتيجي لمكافحة ناقلات داء الشمانيا في الهند.

وأكد (Owino et al., 2012) وحسب بحث Plast باستخدام سلسلة الـ *ITS1* انضمام نموذج واحد بنسبة عالية تصل الى (98.8%) الى سلالة *L. major* في بنك الجينات ومشابهة لسلالتين من *S. squamiplearis*. ولحظ بان (96.9-100%) تعود الى سلالة *L. donovani* في شجرة التطور ولحظ أن هذه التعقيدات جمعت من مرضى من مختلف المناطق التي كانت سلاسلها متوفرة في بنك الجينات. وذكر (Ghasenloo et al., 2016) انه تم أخذ عينات من 130 مريض يشك بإصابتهم بالشمانيا الجلدية باستخدام نظام الشجرة التطوري Mega4 اذ كان 70 (53.8%) و 98 (75.4%) موجبين النتيجة لفحص Restriction Fragment length Polymorphism (RFLP) و *ITS1* على التوالي واستعمل *ITS1* 60 نمو (85.7%) و 10 نماذج (14.3%) شخصت *L. major* و *L. tropica* على التوالي وكان *ITS1* PCR (25.3%) سالب كاذب مقارنة مع الفحص المجهرى لعدم دقة الفحص المجهرى مع التقنيات

الجزئية. كما كشف (Mosawi and Dalimi, 2015) ان احد اهم المشكلات الصحية في أفغانستان هي داء اللشمانيا الجلدي وللتعرف عل أنواعها تم تطبيق تقنيات جزيئية على عينات لـ 64 مريض بداء اللشمانيا الجلدي بجمع نماذج الطفيلي من منطقة هيرات وافغانستان بتضخيم منطقة *ITS1* لـ RNA واستعمال تقنية ITS-PCR-RFLP وبعد استخدام صبغة كيمزا والمجهر الضوئي تبين ظهور 37 من 64 حالة موجبة (58%) وكشف فحص الـ PCR عن 50 حالة إيجابية (78%) من ضمنها 48 حالة (96%) لشمانيا مدارية وحالتين لشمانيا (4%) مما يدل على توطن داء اللشمانيا الجلدي في أفغانستان وانه من النمط السريري الجاف الذي تسببه في الغالب *L. tropica* وأحياناً *L. major* وتم الحصول على بعض النماذج الطافرة والمسجلة بالأرقام (KJ4220582 - KJ420587) في بنك الجينات مقارنة مع بعض النماذج الأخرى في دول الجوار.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion and Recommendation

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات :Conclusion

نستنتج مما تقدم ان التأثير التآزري لعقاري الامفوترسين اللايوسومي ب والثاليدومايد قد سبب ما يأتي:

1. سمية عالية في بروماستكوت اللشمانيا الجلدية *L. tropica* وبروماستكوت اللشمانيا الاحشائية *L. donovani* بتركيز واطئة وذا سمية واطئة جداً داخل جسم الحيوان المختبري.
2. أدى العلاج الى ظهور تغيرات في الشكل الخارجي للطفيلي من المغزلي الى البيضوي او الدائري او غير المنتظم مما يدل على التأثير على نفاذية غشاء الخلية للطفيلي.
3. لاحظ تباين وراثي واضح في التسلسل الجيني للطفيليات في التفاعلات الجزيئية وظهور سلالات جديدة مقاومة للعلاج التآزري مما يدل على فعاليته العالية وتمت ملاحظة مدى التقارب والتباعد بين سلالات الطفيليات المعاملة وغير المعاملة.
4. يمكن استخدام *KMPH* و *ND1* كهدف للمعالجة ضد بروماستكوت اللشمانيا.

التوصيات :Recommendation

1. دراسة التأثير التآزري للثاليدومايد والامفوترسين اللايوسومي في امستكوت *Amastigote* اللشمانيا الجلدية والاحشائية في داخل جسم الانسان.
2. امكانية دراسة التغيرات الشكلية الحاصلة في التركيب الدقيق لهذه الطفيليات ودراسة العضيات الداخلية لها بشكل مفصل بالمجهر الالكتروني.
3. دراسة التأثير التآزري لهذه العقارات على أنواع أخرى من اللشمانيا.
4. دراسة التأثير التآزري للعقارين على الانزيمات التي تشترك في أيض العمليات الحياتية للطفيلي اللشمانيا.
5. دراسة التأثير التآزري على مورثات أخرى.
6. عمل نمط تطوري شجري للشمانيا المحلية مقارنة مع انماط تعود الى دول أخرى لملاحظة مدى التشابه والتقارب بينهما.
7. عدم إعطاء الثاليدومايد او العلاج المتأزر معه للنساء المصابات باللشمانيا خلال فترة الحمل لانه يسبب تشوهات خلقية بالاطراف او انعدام نموها.

المصادر

References

Reference

- Abdou, M. (2020). Leishmaniasis is a Disease Caused by an Intracellular Protozoan Parasite (Genus *Leishmania*) Transmitted by the Bite of a Sand Fly. askhematologist.com
- Abu Rumman, A.A. (2018). Cutaneous Leishmaniasis diseases <https://alrai.com/article/10447176>.
- Adameczick, C.; Dierig, A.; Welzel, T.; Schifferli, A.; Blum, J. and Ritz, N. (2018). Double Trouble: Visceral Leishmaniasis in Twins after Traveling to Tuscany – a Case Report. *J. B. M. C. Inf. Dis.*, 18(495): 1-5.
- Al-Rubai, A. H. M. (2012). Genetic DNA Replication. *J. Bab.*, 17: 37-50
- AL-Chalabi K.A. (1975). Thymidine nucleotide metabolism in trypanosomatidae ph. D Thesis University of Kent at Canterbury.
- Alemayehu, B. and Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite Vector and Reservoir Host. *J. Health. Sci.*, 11(4): 519.
- Al-Hamairy, A. K. (2016). Effect of Lipopolysaccharide Extracted from *Escherichia Coli* on the Growth and Development of Promastigote of *Leishmania tropica* (In Vitro Study). *J. Pharm. Tech.*, 9(4): 377-386.
- Al-Hayali, H. L.; Al-Hammoshi, M. H. and Al-Mushhadani, T. M.(2008). Synthesis and Study Effect of 3,4-Dihydro-4-(p-anis)-6-Phenyl Pyrimidine 2(1H)-One on Growth and Morphology of *Leishmania tropica* Promastigote In Vitro. *Tikrit J. Pure Sci.*, 13(3): 209-218.
- Al-Hayali, H.; Al-Hamadany, A. J. and Al-Kattan, M. M. (2018). Effect of Synthesized Pyrrolidines in Growth of *Leishmania infantum* Promastigotes. *J. T. P. S.*, 23(7): 55-62.

- Al-Healy, H. L. and Al-Chalabi, K. A. (2002). Effect of Chlorpromazine Hydrochloride on *L. major* and *L. donovani* Content of Nucleic Acids and Proteins. *J. Raf. Sci.* 13(1): 137-146.
- Ali, M. A.; Khamesipour, A.; Rahi, A. A.; Mohebbali, M.; Akhavan, A.; Firooz, A. and Keshavarz, H.V. (2018). Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in Some Iraqi Provinces. *J. Mens. Heal.*, 14(4): 18-24.
- Al-Kalid, B. (2018). The Reason for Calling it the Grain of the Year and its Types. *J. Zaito.*, <http://www.zatonmag.com>.
- Al-Khan, H. I.; Al-Hayali, H. L and Al-Mushhadani, T. M. (2006). Effect of Aqueous Extract of *Nerium oleander* and *Melia azedarach* plants on the Morphology and Osmolarity of *Leishmania tropica* promastigotes *In Vitro*. *J. Raf. Sci.*, 17(13): 68-79.
- Al-Khayat, Z. A. Y.; Agha, N. F. S.; Al-Harmni, K. I. F. and Khudhur, y. j. (2018). A Clinico-Epidemiological Study on Cutaneous Leishmaniasis in Erbil, Iraq (2015-2017). *J. Int. T. Res. Dermatol.*, 4(1): 1-7.
- AL-meida, J. V.; de Souza, C. F.; Fuzari, A. A.; Joya, C. A.; Valdivia, h. o.; Bartholomeu, D. C. and Brazil, R. P. (2021). Diagnosis and Identification of *Leishmania* Species in Patients with Cutaneous Leishmaniasis in the State of Roraima, Brazil s Amazon Region. *J. Paras. Vect.*, 14(32): 2-9.
- Al-Nahhas, S. (2006). Isoenzyme Typing and Leishmaniasis Diagnosis. *J. Lab. Diag.*, 4(2): 1-10.
- Al-Obaidi, J.; Al-Hussein, M. Y. and Al-Saqur, I. M. (2016). Survey Study on the Prevalence of Cutaneous Leishmaniasis in Iraq. *J. Iraq. Sci.*, 57(3): 2181-2187.

- Al-Ogaili, N. (2016). Synergistic Effect of *Lawsonia inermis* and *Pganum harmala* Aqueous Extract on *In Vitro* Growth of *Leishmania tropica* Promastigotes Comparison to Sodium Stibogluconate. *J. Al-Qadisi. Med.*, 12(22): 76-83.
- Alvar, J.; Velez, D.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J. and Jannin, J. (2012). WHO Leishmaniasis Control Team, Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. *J. PLoS One*, 7 (5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- Al-Waaly, A. B. M. and Shubber, H. W. K. (2020). Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in Al-Diwaniyah Province, Iraq. *J. Euras. Biosc.*, 14: 269-273.
- Al-Warid, H. S.; Al-Saqr, I. M.; Kadhem, A.J.; Al-Tuwaijari, S. B.; Al-Zadawi, K. A. M. and Gompper, M. E. (2019). Spatial and Demographic Aspects of Kala-azar (Visceral Leishmaniasis) in Iraq During 2011-2013. *J. Trop. Biomed.*, 36(1): 22-34.
- Amalia, H.; Estunungtyas, A.; Ridwan, R.; Sitompul, R.; Adawiyah, R. and Freisleben, H. J. (2020). Pharmacokinetic and Toxicological Studies of Liposomal Amphotericin B Eye Drops on the Rabbit Eye. *J. Inter. Pharm. Res.*, 12(4): 1828-1834.
- Anderson, C. (2005). Lenalidomide and Thalidomide: Mechanisms of Action-Similarities and Differences. *J. Semin. hematol.*, 42: 53-58.
- Andrade, R. M. and Reed, S. L. (2015). New Drug Target in Protozoan Parasites: The Role of Thioredoxin Reductase. *J. F. Microb.*, doi.org/10.3389/fmicb.2015.00975.
- Aronson, N.; Herwaldt, B. L.; Libman, M.; Pearson, R.; Lopez-Velez, R.; Weina, P.; Carvalho, E.; Ephros, M.; Jeronimo, S. and Magill, A. (2017). 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). *J. AM. Trop. Med Hyg.*, 96(1): 24-45.
- Asatsuma-Okumura, T.; Ito, T. and Handa, H. (2020). Molecular Mechanisms of the Teratogenicity Effects of Thalidomide. *J. Pharma.*; 13(5): 95.
- Auwer, G. V. and Dujardin, J. C. (2015). Species Typing in Dermal Leishmaniasis. *J. Clin. Micro. Rev.*, 28 (2): 265-294.
- Auwer, G. V. D. and Dujardin, J. (2015). Species Typing in Dermal Leishmaniasis. *J. Amer. Soci. Micro.*, 28(2): 265-294.
- Bafaghi, A. F.; Noorbala, M.; Noorbala, M. T. and Aghabagheri, M. (2014). Antileishmanial Effect of Zinc Sulphate on the Viability of *Leishmania tropica* and *leishmania major* Promastigotes. *J. Micro. biol.*, 7(9) e11192. DOI:105812/jjm.11192.
- Balasegaram, M.; Ritmeijer K.; Lima, M. A.; Burza, s.; Genovese, O. and Milani, B. (2012). Liposomal Amphotericin B as a Treatment for Human Leishmaniasis. *J. Exp. Opin. Emerg. Drugs.*, 17(4): 493-510.
- Bandani, E., Soflaei, S. and Khalili, F. (2014). Recombinant Plasmid KMP II Gene of *Leishmania major* (pcKMP-11): Production, Characterization and Sequencing. *J. Min. Biot.*, 26(3): 175-182.
- Barley, K; Mubayi, A.; Safan M. and Castillo-Chavez, C. (2019). A Comparative Assessment of Visceral Leishmaniasis Burden in Two Eco-Epidemiologically Different Countries, India and Sudan. *J. Bio. Rxiv.*, doi.org/10.1101/ 592220.
- Bates, P. A. (2018). Revising *Leishmania's* Life Cycle. *J. Nature. Microbio.*; 3: 529-530.

- Bates, P. A.; Depaquit, J.; Galati, E. A. B.; Kamhawi, S. Maroli, M.; McDowell, M. A.; Picado, A. Ready, P. D.; Salomon, O. D.; Shaw, J. J.; Traub-Cseko, Y. M. and Warburg, A. (2015). Recent Advances in Phlebotomine Sand Fly Research Related to Leishmaniasis Control. *J. Paras. Vect.*; 8:131. Doi 10.1186/s13071-015-0712-x
- Belkherroubi-Sari, L; Boucherit, Z.; Boucherit, K. and Belbraouet, S. (2011). Study of Renal Toxicity in Wistar Rats Following the Action of Amphotericin B Solution Prepared Under Extreme PH Conditions. *J. F. N. S.*, (2): 731-735.
- Benjamin C. L. and German, G. R. (1993). Students Study Guide Microbiology. Concepts and Application. Mc Graw-Hill.
- Berman, J. (2019). Liposomal Amphotericin B Treatment and the Leishmaniasis. *J. Am. Trop. Med. Hyg.*, 101(4): 727-728.
- Bora, N. and Jha, A. N. (2020). In Silico Metabolic Pathway Analysis Identifying Target Against Leishmaniasis-Akinetic Modeling Approach. *J. Fro. Gen.*, 11:179. 1-11.
- Brindha, J.; Balamurali, M. M.; and Chanda, K. (2021). An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases- Leishmaniasis and Chagas Diseases. *J. Front. Chem.*, 9(622286): doi:10.3389/fchem.2021.622286.
- Burnett, Y.; Spec, A.; Ahmed, M. M.; Powderly, W. G. and Hamad, Y. (2021). Experience with Liposomal Amphotericin B in Outpatient Parenteral Antimicrobial Therapy. *J. Anti. Age. Chemotherapy*, 65(6): e01876-20. doi:10.1128/AAC.01876-20.
- Burza, S.; Croft, S. and Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *J. Lancet. Inf.*; 392(10151): 951-970.

- Calvopina, M., Gomez, E. A., Sindermann, H., Cooper, P. J., & Hashiguchi, Y. (2006). Relapse of New World diffuse Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Leishmania) Mexicana* After Miltefosine Treatment. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(6), 1074-1077.
- Camacho, E.; Rastrojo, A.; Sanchiz, A. de-la Fuente, S.; Aguado, B. and Requena, J. M. (2019). *Leishmania* Mitochondrial Genomes: Maxicircle Structure and Heterogeneity of Minicircles. *J. Gene.*, 10(758): doi:10.3390/genes10100758.
- Cantacessi, C.; Dantas-Torres, F.; Nolan, M. J. and Otranto, D. (2015). The Past, Present, and Future of *Leishmania* Genomics and Transcriptomics. *J. Tren. Paras.*, 31(3): 100-108.
- Ceccarelli, M.; Diotallevi, A.; Buffi, G.; Santi, M.; Fernandez-Figueroa, E. A.; Rangel- Escareno, C. Munoz-Montero, S. A.; Becker, I.; Magnani, M. and Galluzzi, L. (2020). Differentiation of *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (L.) amazonensis* and *Leishmania (L.) Mexicana* Using Sequential qPCR Assays and High-Resolution Melt Analysis. *J. Micro.*, 8(6): 818.
- Cermakova, p.; Madarova, A.; Barath, P.; Bellova, J.; Yurchenko, V. and Horvath, A. (2021). Differences in Mitochondrial NADH Dehydrogenase Activities in Trypanosomatids. *J. Parasitol.*, 148(10): 1161-1170.
- Chasemloo, H.; Rasti, S.; Delavari, M. and Doroodgar, A. (2016). Molecular Diagnosis of Clinical Isolates of Cutaneous Leishmaniasis Using *ITS1* and KDNA Genes and Genetic Polymorphism of *Leishmania* in Kashan, Iran. *J. Pak. Biol. Sci.*, 19(3): 136-142.

- Chauhan, S. C. and Madhubala, R. (2009). Glyoxalase I Gene Deletion Mutants of *Leishmania donovani* Exhibit Reduced Methylglyoxal Detoxification. *J. Plos.One.*, 4(8): e6805.
- Chavez-Fumagalli, M. A. and Coelho, E. A. F. (2015). New Delivery Systems For Amphotericin B Applied to the Improvement of Leishmaniasis Treatment. *J. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48(3): 235-242.
- Chawla, B. and Madhubala, R. (2010). Drug Targets in *Leishmania*. *J. Paras. Dis.*, 34(1). 1-13.
- Chawla, B.; Jhingran, A.; Panigrahi, A.; Stuart, K. D. and Madhubala, R. (2011). Paromycin Affects Translation and Revealed by Proteomics of Paromomycin- Susceptible- Resistant *Leishmania donovani*. *J. PLoS.*, 6(10): e26660.
- Chen, S.; Zheng, X.; Cao, H.; Jiang, L.; Liu, F. and Sun, Xinli. (2015). A simple and Efficient Method For Extractin of Taq DNA Polymerase. *J. Elect. Biotech.*, doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.08.001.
- Cincura, C.; de Lima, C. M. F.; Machado, P. R. L.; Oliveira-Filho, J.; Glesby, M. J.; Lessa, M. M. and Carvalho, E. M. (2017). Mucosal Leishmaniasis: A Retrospective Study of *Leishmania* (Viannia) *Braziliensis*. *J. Am. Trop. Med. Hyg.*, 79(3): 761-766.
- Clancy, S. (2008). DNA Transcription. *J. Natu. Educ.*, 1(1): 41.
- Corral, M. J.; Gonzalez-Sanchez, E.; Cuquerella, M. and Alunda, J. M. (2014). *In Vitro* Synergistic Effect of Amphotericin B and Allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *J. ASM. Org.*, 58(3): 1596-1602.
- Coutinho, S.; Mendonca, F.; Cysne-Finkelstein, L and Matos, D. C. S. (2015). Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*. *J. Fro. Immu.*, 6(524): doi:10.3389/fimmu. 201`5. 00524.

- Cowell, A. N. and Winzeler, E. A. (2019). Advances in Omics-Based Methods to Identify Novel Target for Malaria and Other Parasitic Protozoan infections. *J. Ger. Med.*, 11: 63-68.
- Croft, S. L. and Olliaro, P. (2011). Leishmaniasis Chemotherapy Challenges and Opportunities. *J. Clin. Micro. Inf.*, 17(10): 1478-1483.
- Cuddihy, G.; Wasan, E. K.; Di, Y and Wasan, K. M. (2019). The Development of Oral Amphotericin B to Treat Systemic Fungal and Parasitic Infections: Has the Myth Been Finally Realized. *J. Pharmaceutics.*, 11(99): doi:10.3390/pharmaceutics11030099.
- Dalimi, A and Nasiri, V. (2020). Design, Construction and Immuogenicity Assessment of Pegfp -N1- *KMP11*-GP96 (Fusion) as a DNA Vaccine Candidate Against *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. *J. Iran. Parasitol.*, 15(1): 11-21.
- Dalimi, A. and Nasiri, V. (2016). Immunization with KMP11-NTGP96-GFP Fusion of *Leishmania major* Induced Th1 Platform Immune Response in Susceptible BALB/c mice. *J. Jundishapur. Micro.*, 9(12): doi:10.5812/jjm.36186.
- Dennis-Lo, Y. M.; Chiu, R. W. K. and Chan, K. C. A. (2006). Clinical Applications of PCR. 2nd Edition. *HUMAN Press*. Totawa. New Jersey., 1-10.
- Dias, L. C.; Dessoay, M. A. and Silva, J. J. N. (2009). Chemotherapy of Chagas Disease: State of the Art and Perspectives for the Development of New Drugs. *J. Quimica. Nova.*, 32(9): 2444-2457.
- Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 20: 441-462.

- Domingo, S.; Sole, C.; Moline, T.; Ferrer, B. and Cortes-Hernandez, J. (2021). Thalidomide Exerts Anti-Inflammatory Effects in Cutaneous Lupus by Inhibiting the IRF4/NF-Kb and AMPK1/Mtor Pathways. *J. Bio. Med.*, 9(12): 1857.
- Drewett, G. P.; Copaescu, A.; Trubiano, J. A.; Deluca, J. and Holmes, N. (2021). Asystolic Cardiac Arrest Following Liposomal Amphotericin B Infusion: Anaphylaxis or Complimen Activation- Related Pseudoallergy. *J. Aller. Asthm. Clin. Immun.*, 17(1): 80. doi.org/10.1186/s13223-021-00582-x.
- Eddaikra, N.; Ait-Oudhia, K.; Oury, B.; Farida, M.; Harrat, Z. and Sereno, D. (2017). Leishmania Antimony Resistance/Susceptibility in Algerian Foci. *J. Op. Trop. Med.*, 1(1): 024-032.
- Ehtisham, M.; Wani, F. and Wani, I. (2016). Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *J. India. Cont. Dentist.*, 4(2): 30-35.
- Eksi, F.; Qzgotasi, O.; Karsligil, T. and Saglam, M. (2017). Genotyping Leishmania Promastigotes Isolated from Patients with Cutaneous Leishmaniasis in South- eastern Turkey. *J. Inter. Med. Res.*, 45(1): 114-122.
- El- Naga, I. F. A.; Mady, R. F. and Mogahed, N. M. F. H. (2020). *In Vitro* Effect of Three Approved Dugs and Their Synergistic Interaction Against *Leishmania infantum*. *J. Biomedica.*, 40(1): 89-101.
- Esch, K. J.; Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *J. Clin. Mico. Rev.*, doi: 10.1128/CMR.00067-12. Source: PubMed.
- Esther. C.; Rastrojo, A.; Sanchiz, A.; Fuente, S. G.; Aguado, B. and Requena, J. M. (2019). Leishmania Mitochondrial Genomes: Maxicircle

- Structure and Heterogeneity of Minicircles. *J. Gen.*, 10: 758. doi: 10.3390/genes10100758.
- Evans, C.R.; Fan, y.; Weiss, K. and Ling, J. (2018). Errors During Gene Expression: Single-Cell Heterogeneity, Stress Resistance, and Microbe-Host Interactions. *J. Mic. Biol.*, 9(4): e01018-18.
- Fakhar, M.; Ghohe, H. P.; Rasooli, S. S.; Karamian, M.; Mohib, A. S.; Hezarijaribi, H. Z.; Pagheh, A. S. and Ghatee, M. A. (2016). Genetic Diversity of *Leishmania tropica* Strains Isolated from Clinical Forms of Cutaneous Leishmaniasis in Rural Districts of Herat Province, Western Afghanistan, Based on *ITS1*-Rdna. *J. Inf. Gen. Evol.*, 41:120-127.
- Fidalgo, L. M. and Gille L. (2011). Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *J. Pharm. Res.*, 28(11): 2758-2770.
- Filgueira, C. P. B.; Moreira, O. C.; Cantanhede, L. M.; Farias, H. M. T.; Porrozi, R.; Britto, C.; Boite, M. C. and Cupolillo, E. (2020). Comparison and Clinical Validation of qpcr Assays Targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 Genes in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J. PLoS. Neg Trop. Dis.*, 14(10): e0008750.
- Fonseca-Silva, F.; Inacio, J. D. F.; Canto-Cavalheiro, M. M. and Almeida-Amaral, E. E. (2011). Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *J. PLoS. One.*, 6(2): e14666. doi:10.1371/journal. Pone.0014666.
- Freites, C. O.; Gundacker, N. D.; Pascale, J. M.; Saldana, A.; Diaz-Suarez, R.; Jimenez, G.; Sosa, N.; Garcia, E.; Jimenez, A.; Suarez, J. A. (2018). First Case of Diffuse Leishmaniasis Associated with *Leishmania Panamensis*. *J. OFID.*; doi: 10.1093/ofid/ofy281.

- Galluzzi, L.; Diotallevi, A.; Menotta, M. and Magnani, M. (2018). Real- Time PCR Applications for Diagnosis of Leishmaniasis. *J. Paras.Vect.*, 11(273): 1-13.
- Garcia, M. J. and Ardila, A. M. (2009). Cell volume variation under different concentrations of saline solution (Macl). *Colomb. Anesthesiol. J. Sci. Elc. Analytics* 37 (2): 0120-3347.
- Garibyan, L. and Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *J. Inves. Dermatol.*, 133(3): 1-4.
- Garrido-Jareno, M.; Sahuquillo-Torralba, A.; Chouman-Arcas, R.; Castro-Hernandez, I.; Moline-Moreno, j.; Llavador-Ros, M.; Gomez-Ruiz, M.; Lopez-Hontangas, j.; Botella-Estrada, R.; Salavert-Lleti, M. and Peman-Garcia, J. (2020). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: Experience of a Mediterranean Hospital. *J. Paras. Vect.*, 13(24): doi. Org/10.1186/s13071-020-3901-1
- Gedda, M. R.; Singh, B. K.; Madhukar, p.; Upadhyay, S.; Singh, O. P.; Sundar, S. (2020). Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis: A Threat to Elimination Program. *J. PLoS Neg. Trop. Dis.*; <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008221>.
- Gedda, M. R.; Sundar, S. and Singh, O. P. (2019). Therapeutic Leishmaniasis: Recent Advancement and Develoments in Nanomedicines. *Biotechnolo.*, 95-120. doi:10.1007/978-981-13-6004-6-6.
- Gervazoni, L. F. O.; Barcellos, G. B.; Ferreira-Paes, T. and Almeida-Amaral, E. E. (2020). Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy:An Overview. *J. Fron. Chem.*, doi.org/10.3389/fchem.2020.579891.

- Ghorbani, M. and Farhoudi, R. (2018). Leishmaniasis in Humans: Drug or Vaccine Therapy. *J. Dru. Des. Dev. Ther.*, 12: 25-40.
- Grba, D. N. and Hirst, J (2020). Mitochondrial Complex I Structural Reveals Ordered Water Molecules for Catalysis and Proton Translocation. *J. Molec. Bio.*, 27: 892-900.
- Griensven, J. N.; Gadisa E.; Assefa, A.; Hailu, A.; Beshah, A. M. and Diro, E. (2016). Treatment of Cutaneous Lishmaniasis Caused by *Leishmania aethiopica*: A Systematic Review. *J. Plos. Neg. Trop. Dis.*, doi:10.1371/journalpntd.000445.
- Guerbouj, S.; Mkada-Driss, I. and Guizani, I. (2014). Molecular /Pathogenesis of Leishmania Parasites. Open Access Peer- Reviewed Chapter. *Tren. Epidemiol.*, doi: 10.5772/57510.
- Guran, M. (2018). An Overview of Leishmaniasis: Historic to Future Perspectives. Books, Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases.; *OpeAccessPeer-reviewedChapter.*, doi:10.5772/intechopen.81643
- Hafiz, S. and Kyriakopoulos, C. (2021). Pentamidine., *Book. Int. License.*, doi://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
- Haldar, A. K.; Sen, P. and Roy, S. (2011). Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *J. Molec. Bio. Intern.*, 23: doi:10.4061/2011/571242.
- Hanada, S.; Uruga, H.; Takaya, H.; Miyamoto, A.; Morokawa, N.; Kurosaki, A. and Kishi, K. (2014). Nebulized Liposomal Amphotericin B For Treatment Aspergillus Empyema with Bronchopleural Fistula. *J. Amer. Resp. Crit. Car. Medicine.*, 189(5): 607-608.

- Hashiguchi, Y.; Gomez, E.; Kato, H.; Martini, L. R.; Velez, L. N. and Uezato, H. (2016). Diffuse and Disseminated Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Cases Experienced in Ecuador and a Brief Review. *J. Trop. Med. Heal.*, 44(2): doi10.1186/s41182-016-0002-0.
- Hassan, I.; Dorjay, K. and Anwar, p. (2015). Thalidomide in Dermatology: Revisited. *J. Indi. Dermatol.*, 60(2): 213.
- Hide, M.; Marion, E.; Pomares, C.; Fisa, R.; Marty, P. and Banuls, A. L. (2013). Parasitic Genotypes Appear to Differ in Leishmaniasis Patients Compared with Asymptomatic Related Carriers. *J. Inter. Parasitol.*, 43(5): 389-397.
- Hirose, Y.; Kitazono, T.; Sezaki, M.; Abe, M.; Sakimura, K.; Funato, H.; Handa, H.; Vogt, K. E. and Yanagisawa, M. (2020). Hypnotic Effect of Thalidomide is Independent of Teratogenic Ubiquitin/Proteasome Pathway. *J. Panas. Latest. Artic.*, doi/ 10.1073/ pnas.197701117.
- Ibrahim, A. S.; Avanessian, V.; Spellberg, B. and Edwards, J. E. (2003). Liposomal Amphotericin B and Not: Amphotericin B Deoxycholate, Improves Survival of Diabetic Mice Infected with *Rhizopus oryzae*. *J. Antimicro. Agen. Chem.*, 47(10): 3343-3344.
- Inceboz, T. (2019). Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis *J. intechopen.*, doi:10.5772/intechopen.86359.
- Intakhan, N.; Chanmol, W.; Somboon, P.; Bates, M.; Yardley, V.; Bates, P. A. And Jariyapan, N. (2020). Antileishmanial Activity and Synergistic Effects of Amphotericin B Deoxycholate with Allicin and Andrographolide Against *Leishmania martiniquensis* in Vitro. *J. Path.*, 9(49): doi:10.3390/pathogens9010049.

- Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y and Handa, H. (2010). Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *J. sci.*, 327(5971): 1345-1350.
- Jain, K. and Jain, N. K. (2013). Novel Therapeutic Strategies for Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J. Drug. Discov. Today.*, 18: 23-24.
- Jensen, R. E. and Englund, P. T. (2012). Network News: The Replication of Kinetoplast DNA. *J. Annu. Rev. Microbiol.*, 66: 473-491.
- Jones, C. M. and Welburn, S. C. (2021). Leishmaniasis Beyond East Africa. *J. Fron. Vet. Sci. Paras.*, doi.org/ 10.3389/ fvets. 2021. 618766.
- Kampjut, D. and Sazanov, L. A. (2020). The Coupling Mechanism of Mammalian Respiratory Complex I. *J. Science.*, 370: eabc4209.
- Kazemi, B. (2011). Genomic Organization of Leishmania Species. *J. Iran. Para.*, 6(3): 1-18.
- Khalil, A. Kamar, A. and Nemer, g. (2020). Talidomide-revisited: are COVID-19 Patients Going to be the Latest Victims of yet Another Theoretical Drug- Repurposing. *J. Fr. Imm* doi.org /10.3389 /fimmu 2020.01248.
- Khan, I.; Khan, M.; Umar, M. N. and Oh, D. (2016). Attenuation and Production of the Amphotericin B- Resistant Leishmania tropica Strain. *J. Jundi. Microbil.*, 9(6): e32159.
- Khan, S.; Khan, I. and Chauhanb, P. M. S. (2015). Antileishmanial Chemotherapy: Present Status and Future Perspectives. *J. Chem. Bio. Int.*, 5(1):1-28.
- Kontoyiannis, D. P.; Hachem, R.; Lewis, R. E.; Rivero, G. A.; Torres, H. A.; Thornby, J.; Champlin, R.; Kantarjian, H.; Bodey, G. P. and Raad, I. I. (2003). Efficacy and Toxicity of Caspofungin in Combination with

- Liposomal Amphotericin B as Primary or Salvage Treatment of Invasive Aspergillosis in Patients with Hematologic Malignancies. *J. Amer. Can. Soc.*, doi.101002/cncr.11479.
- Kumar, V.; Mandal, R.; Das, S.; Kesari, S.; Dinesh, D. S.; Pandey, K.; Das, V. R.; Topno, K.; Sharma, M. P.; Dasgupta, R. K.; and Das, p. (2020). Kala-azar Elimination in a High-Endemic District of Bihar, India: A Success Story. *J. Plos. Negl. Trop. Dis.*, 14(5): e0008254. doi:101371/journal.pntd.0008254..
- Lata, S.; Kumar, G.; Ojha, V. P. and Dhiman R. C. (2021). Detection of *Leishmania donovani* in Wild-Caught Phlebotomine Sand Flies in Endemic Focus of Leishmaniasis in Himachal Pradesh, India. *J. Med. Entomo.*, doi.org/10.1093/jme/tjab202 Research.
- Lee, C. J. J.; Shibata, N.; Wiley, M.; Wells, P. G. (2011). Fluoro thalidomide: A Characterization of Maternal and Developmental Toxicity in Rabbits and Mice. *J. Toxicol. Sci.*, 122(1): 157-169.
- Li, T.; Qiu, Y.; Li, X.; Xiaoun, Z.; Huang, S.; Li, M.; Feng, R.; Chen, B.; He, Y.; Zeng, Z.; Chen, M and Zhang, S. H. (2020). Thalidomide Combined with Azathioprine as Induction and Maintenance Therapy for Azathioprine-Refractory Crohn's Disease Patients. *J. Fro. Med.*, doi: 103389/fmed.2020.557986.
- Li, Y.; Shi, K.; Qi, Feng.; Zhou, T.; Li, X and Xia, J. (2021). Thalidomide Combined with Short- Term Low-Dose Glucocorticoid Therapy for the Treatment of Severe COVID-19: A Case-Series Study. *J. Inter. Infe. Dis.*, 103(1): 507-513.

- Liu, Jian.; Francois, J. and Capp, J. (2019). Gene Expression Noise Produces Cell-to-Cell Heterogeneity in Eukaryotic Homologous Recombination Rate. *J. Fro. Gene.*, 10(475): 1-12.
- Lukes, J.; Butenko, A.; Hashim, H.; Maslov, D. A.; Votypka, J. and Yurchenko, V. (2018). Trypanosomatids are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *J. Para.*, 34: 466-480.
- Mann, S.; Frasca, K. Scherrer, S.; Henao-Martinez, A. F.; Newan, S.; Ramanan, P. and Suarez, J. (2021). A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *J. Cur. Tro. Med. Rep.*, 8:121-132.
- Mansour, D.; Mohammad, H. and Yahya, M. (2016). Study of Genetic Variation of *Leishmania major* Based n Internal Transcribed Spacer 1 (*ITS1*) in Chabahar, Iran. *J. Jund. Micro.*, 9(6): s-0-0.
- Matos, A. P. S.; Vicoso, A. L.; Re, M. I.; Ricci-Junior, E. and Holandino, C. (2020). A Review of Current Treatment Strategies Based on Paromomycin for Leishmaniasis. *J. Dru. Del. Sci. Tech.*, 57: doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101664.
- Meade, J. C. (2019). P-Type Transot ATPases in *Leishmania* and *Trypanosoma*. *J. Para.*, 26: 69. doi. Org /10.1051/parasite/ 2019069.
- Meier, A.; Erler, H. and Beitz, E. (2018). Targeting Channels and Transporters in Protozoan Parasite Infections. *J. Fro. Chem.* doi.org/10.3389/fchem.2018.00088.
- Mendonca, S. C. F.; Cysne-Finkelstein, L. and Matos, D. C. S. (2015). Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*. *J. Fron. Immu.*, 6(524): doi: 10.3389/fimmu.2015.0054.

- Menezes, J. P. B.; Guedes, C. E. S. and Petersen, A. L. O. (2015). Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *J. Bi. Med. Res. Int.*, 11: doi: 10.1155/2015/815023.
- Mercurio, A.; Adriani, G.; Catalano, A.; Carocci, A.; Rao, L.; Lentini, G.; Cavalluzzi, M. M.; Franchini, C.; Vacca, A. and Corbo, F. (2017). A Mini-Review on Thalidomide: Chemistry, Mechanisms of Action, Therapeutic Potential and Anti-Angiogenic Properties in Multiple Myeloma. *J. Curr. Med. Chem.*, 24(25): 2736 -2744_.
- Meriee, M.; Soukkarieh, C. and Abbady, A. Q. A. (2014). Molecular Cloning and Expression of the *Leishmania tropica* KMP-11., *J. Gene. Egypt. Soc. Para.*, 44(2): 321-328.
- Metzker, M. L. and Caskey, C. T. (2009). Polymerase Chain Reaction (PCR). Encyclopedia of Life Sciences (EL,S). John Wiley and Sons, Ltd: Chichester.
- Mishra, J.; Saxena, A. and Singh, S. (2012). Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. *J. Front.Med. Chem.*, 6: 97-130.
- Moen M.; [Lyseng-Williamson, K. A. and Scott, L. J.](#) (2012). Liposomal Amphotericin B: A Review of its Use as Empirical Therapy in Febrile Neutropenia and in the Treatment of Invasive Fungal Infections. *J. Adis. Dru. Eval.*, 69: 316-392.
- Mohapatra, S. (2014). Drug Resistance in Leishmaniasis: Newer Developments. *J. Trop. Paras.*, 4: 4-9.
- Mokobi, F. (2021). Giemsa Stain- Principle, Procedure, Results, Interpretation. *J. Micro. Notes.*,
- Monge-Maillo, B. and Lopez-Velez, R. (2015). Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations. *J. Clin. Infe. Dis.*, 60(9): 1398-1404.

- Monroy-Ostria, A.; Nasereddin, A.; Monteon, V. M.; Guzman-Bracho, C. and Jaffe C. L. (2014). *ITS1* PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of Leishmania in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. *J. Inter. Pers. Inf. Dis.*, doi.org/10.1155/2014/607287.
- Monzote, L. (2009). Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *J. Op. Antimicrob. Age.*, 1: 9-19.
- Moore, E.M. and Lock Wood, D.N. (2010). Treatment of visceral Leishmaniasis: *J.G.I.D.* 21 (2): 151 – 156.
- Mortazavidehkordi, N.; Fallah, A.; Abdullahi, A.; Kia, V.; Khanahmad, H.; Najafabdi, Z. G.; Hashemi, N.; Estiri, B.; Roudbari, Z.; Najafi, A.; Farjadfar, A. and Hejazi, S. H. (2018). A Lentiviral Vaccine Expressing KMP11-HSPB Fusion Protein Increases Immune Response to *Leishmania major* in BALB/C. *J. Parasitol. Res.*, 117: 2265-2273.
- Mosawi, S. H. and Dalimi, A. (2015). Molecular Detection of Leishmania spp. Isolated from Cutaneous Lesions of Patients Referred to Herat Regional Hospital, Afghanistan. *J. Estr. Medit. Heal.*, 21(12): 878-488.
- Mostafavi, M.; Farajzadeh, S.; Sharifi, I.; Khazaeli, P and Sharifi, H. (2019). Leishmanicidal Effects of Amphotericin B in Combination With Selenium Loaded on Niosome Against *Leishmania tropica*. *J. Parasit. Dis.*, 43(2): 176-185.
- Moura, T. R.; Santos, M. L. B.; Braz, J. M.; Santos, L. F. V. C.; Aragao, M. T.; de Oliveira, A.; Santos, P. L.; Silva, A. M.; de Jesus, A. R. and de Almeida. (2016). Cross-resistance of *Leishmania Infantum* Isolates to Nitric Oxide from Patients Refractory to Antimony Treatment, and Greater Tolerance to Antileishmanial Responses by Macrophages. *J. Paras. Reser.*, 115: 713-721.

- Nail, A. M. and Imam, A. M. (2013). Visceral Leishmaniasis: Clinical and Demographic Features in an African Population. *J. Pak. Med. Sci.*, 29(2): 485-489.
- Nampoothiri, R. V.; Sreedharannni, S.; Chhabria, B. A. and Jain, S. (2016). Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. *An. Inter. J. med.*, 109(5): 347-348.
- Nassar, A. A.; Abdelrazzaq, M. H.; Almahaqri, A. H.; Al-Amad, M. A.; Al-Serouri, A. A. and Khader, y. s. (2021). Cutaneous Leishmaniasis Outbreak Investigation in Hajjah Governorate, Yemen, in 2018: Case-Control Study. *J. Mir.Org.*, 7(5): e27442. doi:10.2196/27442.
- Nazzaro, G. M. D.; Rovaris, M. M. D. and Vealdi, S. M. D. (2014). Leishmaniasis: A Disease with Many Names. *J. Dermatol.* 150(11): 1204-1204.
- Neto, R. L. M.; Sousa, L. M. A.; Dias, C. S.; Filho, J. M. B.; Oliveira, M. R. and Figueiredo, R. C. B Q. (2011). Morphologica and Physiological Changes in Leishmania Promastigotes Induced by Yangambin, a Lignan Obtained from *Ocotea duckei*. *J. Exprim. Parasitol.*, 127: 215-221.
- Nettles, C.; Torrens, R. and Cena, C. (2021). Polymerase Chain Reaction (PCR) Steps, Stages and Order. *Texas Life Sci.*, 238: 7-12.
- Ortiz, D.; Forquer, I.; Boitz, J.; Soysa, R.; Elya, C. and Fulwiler, A. (2016). Targeting the Cytochrome bc1 Complex of Leishmania Parasites for Discovery of Novel Dugs. *J. Antimicob. Age. Chemo.*, 60(8): 4972-4982.
- Oshaghi, M. A.; Rassi, Y.; Hazratian, T.; Fallah, E. and Rafizadeh, S. (2013). Natural Infection of Wild Caught *Phleotomus tobbi* to *Leishmania infantum* in East Azerbaijan Province, Northwestern Iran. *J. Vector Borne Dis* 50., 24-29.

- Osman, A. A. M. (2011). Assessment of Demographic and Nutritional Factors on Leishmaniasis in Sudan. *J. Bio. Med Res.*, 22(4): 211-216.
- Owino, B. O.; Mwangi, J. M.; Kiplagat, S.; Mwangi, H. N.; Ingonga, J. M.; Chebet, A.; Ngumbi, P. M.; Villinger J.; Masiga, D. K. and Matoke-Muhia, D. (2021). Molecular Detection of *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, and Trypanosoma Species in Sergentomyia Squamipleuris Sand Flies from a Visceral Leishmaniasis Focus in Merti Sub-Country, Eastern Kenya. *J. Paras. Vecto.* 14(53): 1-11.
- Paladi, C. S.; Silva, D. A. M.; Motta, P. D.; Garicia, D. M.; Teixeira, D. Longo-Mougeri, L. M.; Katz, S. and Barbieri, C. L. (2017). Treatment of *Leishmania* (L.) *Amanuensis* Infected Mice with a Combination of a Palla da Cycle Complex and Heat-Killed Propionic Bacterium Acres Triggers Protective Cellular Immune Responses. *JFMICB*, 8: 333 doi:10.3389/fmicb.2017.00333.
- Palladini, G.; Perfetti, V.; Perlini, S.; Obici, L. and Riccardo, S. (2005). The Combination of Thalidomide and Intermediate-Dose Dexamethasone is an Effective but Toxic Treatment for Patients with Primary Amyloidosis (AL). *J. Blood.*, 105(7): 2949-2951.
- Pandey, K.; Bastola, A.; Haiyan, G.; Pyakurel, U. R.; Pandey, B. D. and Dumre, p. (2021). Emergence of Cutaneous Leishmaniasis in Nepal. *J. Trop. Med. Heal.*, 49(72): doi.org/10.1186/s41182-021-003593.
- Pigotti, D. M.; Bhatt, S.; Golding, N.; Duda, K. A.; Battle, K. E.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Balard, Y.; Bastien, P.; Pratlong, F.; Brownstein, J. S.; Freifeld, C. C.; Mekaru, S. R.; Gething, P. W.; George, D. B.; Myers, M. F.; Reithinger, R. and Hay, S. (2014). Global Distribution Maps of the Leishmaniasis. *J. E. Life*, eo2851. doi: 10.7554/eLife.02851.

- Pinto-Martinez, A.; Rodriguez-Duran, J.; Serrano-Mari, x.; Hernandez-Rodriguez, V. and Benaim, G. (2018). Mechanism of Action of Miltefosine on *Leishmania donovani* Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca^{2+} Channel. *J. Anti. Age. Chem.*, 62(1): e01614-17.
- Purkait, B.; Kumar, A.; Nandi, N.; Sardar, A.; Das, S.; Kumar, S.; Pandey, k.; Ravida, V.; Kumar, M.; Singh, T. D. and Das, P. (2012). Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. *J. Anti. Age. Chemo.*, doi.org/10.1128/AAC.00030-11.
- Quimioter, R. E. (2012). Impact of Liposomal Amphotericin B on Renal Function in Critically Ill Patients with Renal Function Impairment. *J. Ori.*, 25(3): 206-215.
- Radwan, M. A.; Al- Quadeib, B. T.; Siller, L.; Wright, M. C. and Horrocks, B. (2017). Oral Administration of Amphotericin B Nanoparticles: Antifungal Activity, Bioavailability and Toxicity in Rats. *J. Dru. De.*, 24(1): 40-50.
- Rammaert, B.; Candon, S.; Maunoury, C.; Bougnoux, M.; Jouvion, G.; Braun, T.; Correas, J and Lortholary, O. (2017). Thalidomide for Steroid-dependent Chronic Disseminated Candidiasis after Stem Cell Transplantation: A Case Report. *J. Transpl. Infect. Dis.*, 19(1)., doi: 10.1111/tid. 12637. Epub 2016 Dec 25.
- Ramos-Martinez, E.; Gutierrez-Kobeh, L. and Villasenor-Cardoso, M. (2015). The Role of Vitamin D in the Control of Leishmania Infection. *J. Canadian. Physi. Pharm.*, doi.org/10.1139/cipp-2014-0372.
- Rashid, H.; Ullah, I.; Adeeb, H.; Zeb, M; Mohammad, A. and Rehman, N. (2020). Synergistic Effect of Oral Allopurionl and Lntralesional

- Sodium Stibogluconate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *J. Ayu. Med. Coll. Abbottabad.*, 32(4): 558-561.
- Read, L. K.; Lukes, j. and Hashimi, H. (2016). Trypanosome RNA Editing: The Complexity of Getting U in and Taking U Out. *J. Wil. Inter. Rev.*, 7: 33- 51.
- Redrejo-Rodriguez, M.; Ordonez, C. D.; Berjon-Otero, M.; Forterre, P.; Salas, M. and Krupovic, M. (2017). Primer-Independent DNA Synthesis by DNA Polymerase From Self-Replicating Mobile Genetic Elements. *J. Cel. Repo.*, doi. Org/10.1016/j. celrep.2017.10.039.
- Reimao, J. Q.; Coser, E. M.; Lee, M. R. and Coelho, A. C. (2020). Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *J. Microoraganisms.*, 8(11): 1632
- Ren, D.; Cao, W.; Liu, X.; Han, Q.; Fan, W.; Li, G.; Xia, Han and Zhang, X. (2021). Cas Report: Use of Liposomal Amphotericin B in Low Doses in Patient with Visceral Leishmaniasis. *J. Fro. Med.*, 8:766400. doi. Org/10.3389/fmed.2021.766400.
- Rezaei, Z.; Azarang, E.; Shahabi, S.; Omidian, M.; Pourabbas, B. and Sarkari, B. (2020). Leishmania ITSI IS Genetically Divergent in Asymptomatic and symptomatic visceral Leishmaniasis: Results of a study in southern Iran. *J. Tr. M.*, ID5351098 (7). Doi:org/10.1155/2020/5351098.
- Ribeiro, T. G. ; Chavez-Fumagalli, M. A. and Valadares, D. G. (2014). Antileishmanial Activity and Cytotoxicity of Brazilian Plants. *J. Exp. Paras.*, 143: 60-68.
- Rice, G. (2021). Polymerase Chin Reaction: (PCR). *J. Microb. Lif. Educ. Reso.*, doi:serc.carleton.edu/15924.

- Rittie, L. and Perbal, B. (2008). Enzymes used in Molecular Biology: a Useful Guide. *J. Cell. Com. Signal.*, 2: 25-45.
- Roberts, J.; Bingham, J.; McLaren, A. S. and Mclemore, R. (2015). Liposomal Formulation Decreases Toxicity of Amphotericin B *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Clin. Orthop. Relat. Res.*, (473): 2262-2269.
- Robert, K. ; Johnstone, I. ; Milkah, M. ; Dennis, M. ; Reuben, L. ; Japhet, M. and Willy, T. (2011). Immunization with a Combination of *Leishmania major* Lipophospho-glycan (LPG) and Phlebotomus Duboscqi Salivary Gland Lysates (SGLs) Abrogates Protective Effect of LPG Against L. major in BALB/c Mice. *African, J. H. Sci.*, (18): 1-2.
- Sabzevari, S.; Mohebbali, M.; Hashemi, S. A. (2020). Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Parasites, Vectors and Reservoir Host in Endemic Foci of North Khorasan, Northeastern Iran- a Narrative Review. *J. Med, Microbiol. Infect. Dis.*, 8(2): 40-44.
- Sachdeva, H. and Sharma, M. (2016). Clinical Manifestations of Leishmaniasis: A Review. *J. I. Arest.*, 3(12): 3093-3095.
- Sadlova, J.; Podesvova. L.; Becvar, T.; Bianchi, C.; Gerasimov, E. S. and Saura, A. (2021). Catalase impairs *Leishmania Mexicana* Development and Virulence. *J. Open. A.*, 12(1): 852-867.
- Sampaio, R. N. R.; Ferreira, M. F.; Martins, S. S. and da Motta J. O. C. (2021). Successful Treatment of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*. *J. Ana. Bras. De Dermat.*, 96(5): 602-604.
- Sannigrahi, A.; Maity, p.; Karmakar, s. and Chattopadhyay, K. (2017). Interaction of KMP-11 with Phospholipid Membranes and its

- Implications in Leishmaniasis: Effect of Single Tryptophan Mutations and Cholesterol. *J. Phys. Chem. B.*, 121(8): 1824-1834.
- Sannigrahi, A.; Mullick, D.; Sanyal, D.; Sen, Sagnik.; Maulick, U. and Chattopadhyay, K. (2019). Effect of Ergosterol on the Binding of KMP-II With Phospholipid Membranes: Implications in Leishmaniasis. *J. ACS. Omega.*, 4(3): 5155-5164.
- Sarvolatz, L.; Bern, Caryn.; Adler-Moor, J.; Berenguer, J.; Boelaert, M.; Boer, M. D.; Davidson, R. N.; Figueras, C.; Gradoni, I. and Kafetzis, D. A. (2006). Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Inf. Dis.* 43(7): 917-924.
- Scott, P. H. and Novais, F. O. (2016). Cutaneous Leishmaniasis: Immune Responses in Protection and Pathogenesis. *J. Nat. Rev. Immunol.*, 16: 581-592.
- Shadab, M.; Jha, B.; Asad, M.; Deepthi, M.; Kamran, M and Ali, N. (2017). Apoptosis-Like Cell Death in *Leishmania donovani* Treated with Kalsome TM10, a New Liposomal Amphotericin B. *J. PloS. One.*, 12(2): e0171306.
- Shafiei, R.; Kalantari, M.; Yousefi, M.; Aspatwar, A.; Arzamani, K.; Bozorgomid, A.; Mirahmadi, H.; Soleimani, A. and Raeghi, S. (2021). Bonomics and Phylo- Molecular Analysis of *Leishmania* Species Isolated from Human Lesions Using *ITS1* Genes in North- East of Iran. *J. Para. Dis.*, doi.org/10.1007/s12639-021-01360-7.
- Shahzad, S.; Afzal, M.; Sikandar, S. and Afzal, I. (2020). Polymerase Chain Reaction. *Open access peer-reviewed Chapter.*, doi:10.5772/intechopen.81924.
- Sherbet, G.V. (2015). Therapeutic Potential of Thalidomide and its Analogues in the Treatment of Cancer. *J. Anti. Can. Res.*, (35): 5767-5772.

- Shirzadi, M. R. (2019). Liposomal Amphotericin B: A Review of its Properties, Function, and Use for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *J. Res. Rep. Trop. Med.*, 10: 11-18.
- Silva, E. R.; Boechate, N. and Luiz, C. S. (2015). Novel Selection Inhibitor of *Leishmania amazonensis* Arginase. *J. Chem. Biol. Dru. Des.*, 86(5): 969-978.
- Silva-Jardim, I.; Thiemann, O. H. and Anibal, F. F. (2014). Leishmaniasis and Chagas Disease Chemotherapy: A Critical Review. *J. Braz. Chem. Soc.*, 25(10): 1810-1823.
- Silva-Lopez, R. E.; Morgado-Diaz, J. A.; Chavez, M. A. and Simone, S. G. (2007). Effect of Serine Protease Inhibitors on Viability and Morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Promastigotes. *J. Parasitol. Res.*, doi:10.1007/s00436-007-0706-5.
- Simpson, L., Douglass, S. M., Lake, J. A., Pellegrini, M. and Li, F. (2015). Comparison of the Mitochondrial Genomes and Steady State Transcriptomes of Two Strains of the Trypanosomatid Parasite, *Leishmania tarentolae*. *J. PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 9: e0003841.
- Soflaei, S.; Dalimi, A. and Ghafarifar, F. (2012). Molecular Cloning and Expression of the *Leishmania infantum* KMP-II Gene. *J. Microbiol.*, 6(2): 132-137.
- Solgi, G.; Kariminia, A. and Abdi, K. Darabi, M. and Charechozloo, B. (2006). Effect of Combined Therapy with Thalidomide and Glucantime on Leishmaniasis Induced by *Leishmania Major* in BALB/ c Mice. *K. J. Para.*, 44(1): 55 - 61.
- Sousa, S. M.; Gomes, R. A. and Ferreira, A. E. (2013). The Glyoxalase Pathway: The First Hundred Years and Beyond. *J. Biochem.*, 453(1): 1-15.

- Sousa-Gomes, M. L.; Romero, G. A. S. and Werneck, G. L. (2017). Visceral Leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: are we aware Enough? *J. PLOS. Negl. Trop. Dis.*, 11(9): e0005772. doi. Org/10.1371/journal.pntd.0005772.
- Srinivasan, R.; Ahmad, T.; Raghavan, V.; Kaushik, M. and Pathak, R. (2018). Positive Influence of Behavior Change Communication on Knowledge, Attitudes, and Practices for Visceral Leishmaniasis/Kala-azar in India. *J. Glo. Helth. Sci. Pra.*, 6(1):192-209.
- Stephen, W. (2008). Antiparasitic Drugs, in Small Animal Clinical Pharmacology. *Chap.*, 10: 198-260.
- Steverding, D. (2017). The History of Leishmaniasis. *J. Paras. Vect.*, 10(82): doi:10.1186/s13071-017-2028-5.
- Stone, N. R.; Bicanic, T.; Salim, R. and Hope, W. (2017). Liposomal Amphotericin B (AmBisome): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. *J. Dru.*, 76(4): 485-500.
- Stoops, C. A.; Heintshcel, B.; El-Hossary, S.; Kaldas, R. M.; Obenauer, P. J.; Farooq, M. and Villinski, J. T. (2013). Sand Fly Surveillance and Control on Camp Ramadi, Iraq, as Part of a Leishmaniasis Control Program. *J. Vect. Ecolo.*; 38(2): 411-414.
- Sundar, S and Chakravarty, J. (2010). Liposomal Amphotericin B and Leishmaniasis: Dose and Response. *J. Gl. Inf. Dis.*, 2(2). DOI:10.4103/0974-777X.62886.
- Sunter, J. and Gull, K. (2018). Shape, Form, Function and Leishmania Pathogenicity: From Textbook Descriptions to Biological

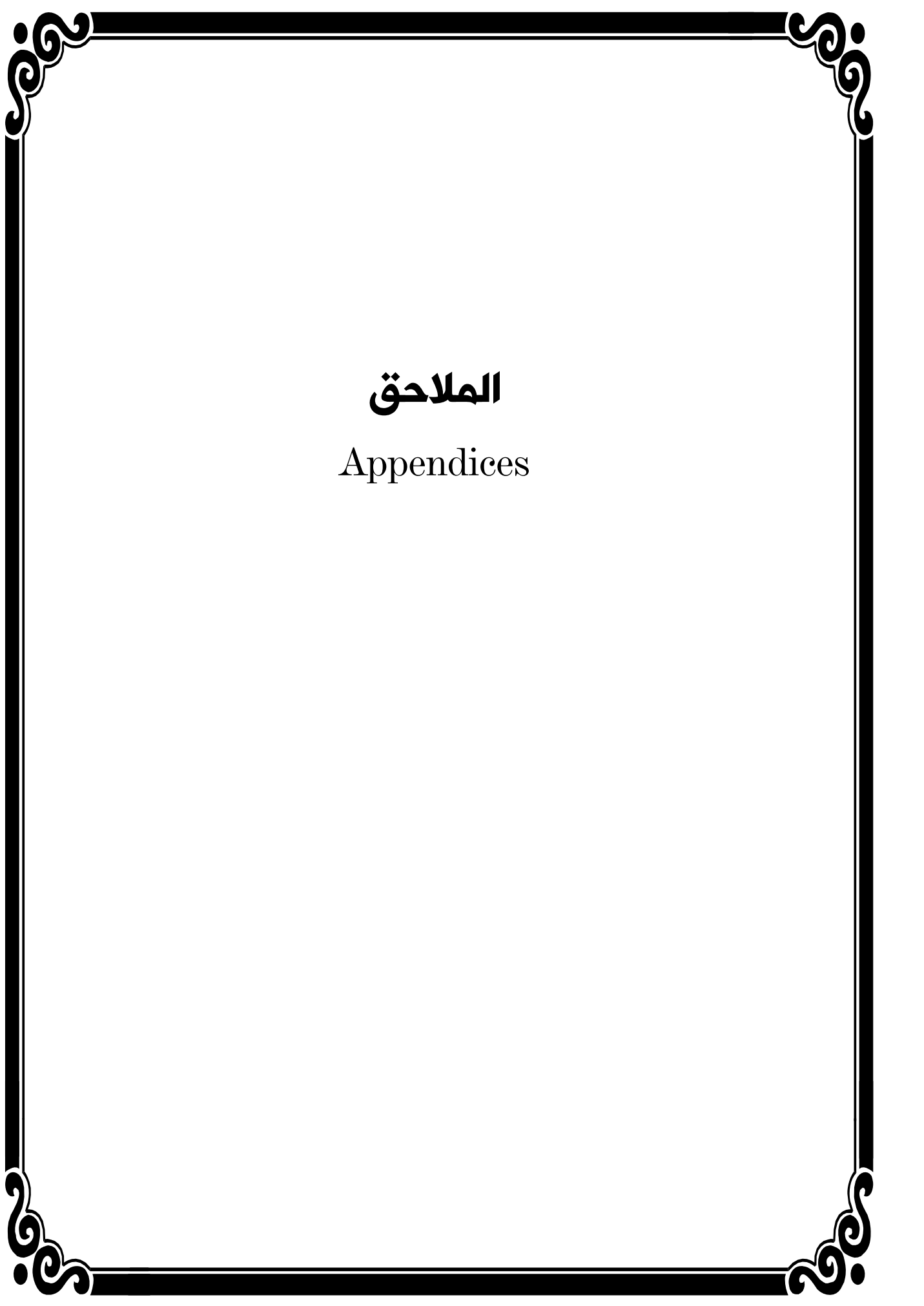
- Understanding. *J. Open. Biol.*, 7: 170165. doi.org/10.1098/rsob.170165.
- Taanman, J. (1999). The Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication. *J. Bioch. Bioph. Act. Bioeng.*, 1410 (2): 103-123.
- Taj-Eldin, S. D. and Alousi, K. (1954). Kala-azar in Iraq. Report of Four Cases. *J. Fac. Biol.*, 18(1-2):15-19.
- Takele, Y.; Abebe, T. and Weldegebreal, T. (2013). Arginase Activity in the Blood of Patients with Visceral Lishmaniasis in Bihar (India). *J. Tran R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94:156-157.
- Tamiru, A.; Tigabu, B.; Yifru, S.; Diro, E. and Hailu, A. (2016). Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B for Treatment of Complicated Visceral Leishmaniasis in Patients without HIV, North- West Ethiopia. *J. BMC. Inf. Dis.*, 16(548): doi.10.1186/ s12879-016-1746-1.
- Tantibanchachai, C. and Yang, J. (2014). Studies of Thalidomide' s Effects on Rodent Embryos from 1962-2008. *J. Embr. Proj. Ency.*, 23(56): 1-3.
- Tavares, G. S.; Mendonca, D. V. C.; Lage, D. P.; Granato, J. T.; Ottoni F. M.; Ludolf, F.; Charez-Fumagalli, M. A. C.; Duarte, M. C.; Taraves, C. A. P.; Alves, R. J.; Coimbra, E. S. and Coelno, E. A. F. (2018). Anti Leishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Species. *J. B. C. P. T.*, 123(3):236-246.
- Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Rodrigues, J. C. F.; Crepaldi, P. H.; Pimenta, P. F. and de Souza. W. (2013). The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. *J. Plos. Path.*, 9(10): e1003594.
- Teixeira-Santos, R.; Ricardo, E.; Branco, R. J.; Azevedo, M. M; Rodrigues, A. G. and Pina-Vaz, C. (2016). Unveiling the Synergistic Interaction

- Between Liposomal Amphotericin B and Colistin. *J. Fro. Micro.*, doi.org/10.3389/fmicb.2016.01439.
- Teo, S. K.; Evans, M. G.; Brockman, M. K.; Ehrhart, J.; Morgan, M.; Stirling, D. I. and Thomas, S. (2001). Safety Profile of Thalidomide after 53 Weeks of Administration in Beagle Dogs. *J. Toxicol.*, (59): 160-168.
- Teo, S. K.; Nancy, T. J.; Mary, S. E.; Michael Thomas, M. J. and Steve D. (1999). Sub Chronic Toxicity of Thalidomide in Rodents After 13 Weeks of Oral Administration. *J. Toxicol.*, 18(5): 337-352.
- Tobie, E. J.; Brand, T. V. and Mehlman, B. (1950). Cultural and Physiological Observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. *J. Parasitol.*, 36(1): 48-54.
- Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M. R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: A Review Version 1; Peer review: 2 approved. *J. F1000Res.*, 6: 750. doi: [10.12688/f1000research.11120.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1)
- Toz, S. O.; Culha, G.; Zeyrek, F. Y.; Ertabaklar, H.; Alkan, M. Z.; Vardarli, A. T.; Gunduz, c. and Ozbel, Y. (2013). A Real- Time *ITS1*- PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of Leishmania Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. *J. PLoS. Neg. Trop. Diseases.*, 7(5): e2205.
- Ubals, M.; Bosch-Nicolau, P.; Sanchez-Montalva, A.; Salvador, F.; Aparicio-Espanol, G.; Sulleiro, E.; Silgado, A.; Soriano-Arandes, A.; Espiau, M.; Ferrer, B.; Pou, D.; Trevino, B.; Molina, I. and Garcia-Paos, V. (2021). Treatment of Complex Cutaneous Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *J. Pathogens.*, 10(1253): doi.org/ 10.3390/pathogens10101253.

- Uliana, S. R. B.; Trinconi, C. T. and Coelho, A. C. (2017). Chemotherapy of Leishmaniasis: present Challenges. *J. Parasitol.*, 145(4). doi: <https://doi.org/10.1017/s003//820/62523>.
- Upputuri, B.; Pallapati, M. S. Tarwater, P and Srikantam, A. (2020). Thalidomide in the Treatment of Erythema Nodosum Leprosum (ENL) in Anoutpatient Setting. *J. PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 14(10): e0008678. doi:10.1371 <https://doi.org/10.1371/>
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide- Induced Teratogenesis. *J. Bir. Defe. Res.(Part C)*., 105:140-156.
- Vashishtha, A. K.; Wang, J. and Konigsberg, W. h. (2016). Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases. *J. Am. So. Bio. Mol. Biol.*, 291(40): 20869-20875.
- Vechi, H. T.; Sousa, A. S.V.; Cunha, M. A.; Shaw, J. J. and Luz, K. G. (2020). Case Report Combination Therapy with Liposomal Amphotericin B, N-Methyl Meglumine Antimoniate, and Pentamidine Isethionate for Disseminated Visceral Leishmaniasis in a Splenectomized Adult Patient. *J. Am. Trop. Med. Hyg.*, 102(2): 268-273.
- Vilchez-Sanchez, F.; Leis, B.; J.; M.; Sendagorta, E.; Ramirez, E.; Fiandor, A.; Bellon, T.; Alvarez, S.; T.;Ocando,. H.; Revuelto, H. R. and Cabanas, R. (2022). Allopurinol Induced – Dress and Neo-Sensitization to Talidomide: Complex Management and Diagnosis in a Patient with Multiple Myeloma. *J. Inves. Aller. Clin. Immun.*, 32(5): doi:1018176/jiaci.0776.
- Vioti, G.; Leonel, J. A. F.; Lemes, K. M.; Pereira, H. L.; Keid, L. B.; Madureira, H.; Soares, R. M.; Benassi, J. C. and Oliveira,T. M. F. S. (2019). Molecular Detection of Leismania spp. In Cattle from Brazil by

- Means of PCR Using Internal Transcribed Spacer1. *J. Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 28(2): 303-305.
- Walsh, T. J.; Lewis, R. E. and Adler-Moore, J. (2019). Pharmacology of Liposomal Amphotericin B: An Introduction to Preclinical and Clinical Advances for Treatment of Life-Threatening Invasive Fungal Infections. *J. Clin. Inf. Dis.*, 68(4): S241-S243.
- Wang, D.; Zhang, W.; Jie-Xi, J.; Wang, L.; Huang, R.; Xu, Y. Zhang, H. and Jin-Long. (2021). Gender Differences in Acute Toxicity, Toxicokinetic and Tissue Distribution of Amphotericin B Liposomal in Rats. *J. Toxic. Lett.*, 338(1): 78-84.
- Ware, J. M.; Connell, E. M.; Brown, T.; Wetzler, L.; Talaat, K. R.; Nutman, T. B. and Nash, T. E. (2021). Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *J. Clin. Inf. Dis.* 73(7): 2457-2562.
- WHO. Global Health Observatory Data Leishmaniasis. <http://www.who.int/gho/neglected-diseases/leishmaniasis/en>(2020).
- Wijnant, G.; Bocxlaer, K. V.; Yardley, V.; Harris, A.; Alavijeh, M.; Silva-Pedrosa, R.; Antunes, S.; Mauricio, I.; Murdan, S and Croft, S. L. (2018). Comparative Efficacy, Toxicity and Biodistribution of the Liposomal Amphotericin B Formulations Fungisome and AmBisome in Murine Cutaneous Leishmaniasis. *J. Dru and Dru. Resis.*, 8(1): 223-228.
- Yatawara, L.; Le, T. H.; Wickramasinghe, S. and Agatsuma, T. (2008). Maxicircle (Mitochondrial) Genome Sequence (Partial) of *Leishmania major*: Gene Content, Arrangement and Composition Compared with *Leishmania Tarentolae*. *J. Gene.*, 434: 80-86.

- Zacarias, D. A.; Rolao, N.; de Pinho, F. A.; Sene, I.; Silva, J. C.; Cost, D. L.; Costa, C. H. N. (2017). Causes and Consequences of Higher *Leishmania infantum* Burden in Patients with Kala-Azar: A Study of 625 Patients. *Trop. Med. Intel. Health*, 22(6): 679-687.
- Zhu, T. R.; Nadelmann, E. R.; Cohen, S. R. and Mph, M. D. (2021). Complete Remission of Intractable Bullous Erythema Multiforme With Thalidomide Therapy: A Case Series. *J. D. C. R.*, 15: 76-79.
- Zijlstra, E. E. (2016). The Immunology of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). *J. Para. Vect.*, 9:464. doi 10.1186/s 3071-016-1721-0.



الملاحق

Appendices



الملحق (1)

9/11/21, 10:36 PM

Leishmania tropica Nes-H1 DNA, internal transcribed spacer 1, partial - Nucleotide - NCBI

Nucleotide ▼

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)[Research information \(NIH\)](#)[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)[Español](#)

FASTA

Leishmania tropica Nes-H1 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: LC650026.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>LC650026.1 Leishmania tropica Nes-H1 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence
CTGGATCATTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGGGGAGGCTTGTGTTTTCTAGCAAGCC
TTTCCCACAGATACGCAATACAATCTATATATATATATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAA
AAAGGCCGATCGACGTTAACATATCGCGTATACAACAAAAAGTTCTGTTCTACGGCTTTTTTTTGGCGG
CGTGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTCTGTTGAAGAACGC
AGTAAAGTGCGATAAGTGGTATCA
```




الملحق (2)

9/11/21, 10:36 PM

Leishmania tropica Nes-H1 DNA, internal transcribed spacer 1, partial - Nucleotide - NCBI

Nucleotide

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)[Research information \(NIH\)](#)[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)[Español](#)

GenBank

Leishmania tropica Nes-H1 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: LC650026.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

```
LOCUS      LC650026               304 bp    DNA     linear   INV 08-SEP-2021
DEFINITION Leishmania tropica Nes-H1 DNA, internal transcribed spacer 1,
            partial sequence.
ACCESSION  LC650026
VERSION   LC650026.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Leishmania tropica
  ORGANISM Leishmania tropica
            Eukaryota; Discoba; Euglenozoa; Kinetoplastea; Metakinetoplastina;
            Trypanosomatida; Trypanosomatidae; Leishmaniinae; Leishmania.
REFERENCE  1
  AUTHORS  Almamary,N.I. and Alhayali,H.L.
  TITLE    Biomolecular Effect of synergism of thalidomide and liposomal
            amphotericin -B-on Leishmania tropica promastigote
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 304)
  AUTHORS  Almamary,N.I. and Alhayali,H.L.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (05-SEP-2021) Contact:Nasma Idrees Almamary Biotechnology
            center/Al-Nahrain University/Baghdad, Biotechnology center; Mosul
            street, Mosul, Ninawa 09334, Iraq
FEATURES   Location/Qualifiers
            source             1..304
                                /organism="Leishmania tropica"
                                /mol_type="genomic DNA"
                                /isolate="Nes-H1"
                                /db_xref="taxon:5666"
                                /country="Iraq: Mosul"
                                /collection_date="2021-06-02"
            misc RNA              <1..>304
                                /product="internal transcribed spacer 1"
ORIGIN
1 ctggatcatt ttccgatgat tacacaaaa aacatacaac tccggggagg cttgtgtttt
61 ctagcaagcc ttcccacag atacgaata caatctatat atatatatat atatatatat
121 agacacaaca tacagtagaa aaaggccgat cgacgttaac atatcgcgta tacaacaaaa
181 aagttcgttc tacggctttt tttttggcgg cgtgcgtgga taacggctca cataacgtgt
241 cgcgatggat gacttggcctt cctatttcgt tgaagaacgc agtaaagtcg gataagtggt
301 atca
//
```



الملحق (3)

9/11/21, 10:37 PM

Leishmania tropica Nes-H2 DNA, internal transcribed spacer 1, partial - Nucleotide - NCBI

Nucleotide ▼

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)[Research information \(NIH\)](#)[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)[Español](#)

FASTA

Leishmania tropica Nes-H2 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: LC650027.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>LC650027.1 Leishmania tropica Nes-H2 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence
CTGGATCATTTCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGGGAGGCTTGTTTCTAGCAAGCC
TTTCCACAGATACGCAATACAATCTATATATATATATATATATATATAGACACAACATACAGTAGAA
AAAGGCCGATCGACGTTAACATATCGCGTATACAACAAAAAGTTCTTCTACGGCTTTTTTTTGGCGG
CGTGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGC
AGTAAAGTGCATAAGTGGTATC
```



الملحق (4)

9/11/21, 10:37 PM

Leishmania tropica Nes-H2 DNA, internal transcribed spacer 1, partial - Nucleotide - NCBI

Nucleotide

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)[Research information \(NIH\)](#)[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)[Español](#)

GenBank

Leishmania tropica Nes-H2 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: LC650027.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS LC650027 303 bp DNA linear INV 08-SEP-2021
DEFINITION Leishmania tropica Nes-H2 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence.
ACCESSION LC650027
VERSION LC650027.1
KEYWORDS .
SOURCE Leishmania tropica
ORGANISM [Leishmania tropica](#)
Eukaryota; Discoba; Euglenozoa; Kinetoplastea; Metakinetoplastina; Trypanosomatida; Trypanosomatidae; Leishmaniinae; Leishmania.
REFERENCE 1
AUTHORS Almamary, N.I. and Alhayali, H.L.
TITLE Biomolecular Effect of synergism of thalidomide and liposomal amphotericin -B-on Leishmania tropica promastigote
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 303)
AUTHORS Almamary, N.I. and Alhayali, H.L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-SEP-2021) Contact: Nasma Idrees Almamary Biotechnology center/Al-Nahrain University/Baghdad, Biotechnology center; Mosul street, Mosul, Ninawa 09334, Iraq
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..303
/organism="Leishmania tropica"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Nes-H2"
/db_xref="taxon:5666"
/country="Iraq: Mosul"
/collection_date="2021-06-02"
[misc RNA](#) <1..>303
/product="internal transcribed spacer 1"
ORIGIN
1 ctggatcatt ttccgatgat tacacaaaa aacatacaac tccggggagg cttgtgtttt
61 cttagcaagcc ttccacacag atacgcaata caatctatat atatatatat atatatatat
121 agacacaaca tacagtagaa aaaggccgat cgacgttaac atatcgcgta tacaacaaaa
181 aagttcgttc tacggctttt ttttggcgg cgtgcgtgga taacgggtca cataacgtgt
241 cgcgatggat gacttggcct cctatttcgt tgaagaacgc agtaaaagtgc gataagtggg
301 atc
//



الملحق (5)

9/11/21, 10:37 PM

Leishmania tropica Nes-H3 DNA, internal transcribed spacer 1, partial - Nucleotide - NCBI

Nucleotide ▼

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)[Research information \(NIH\)](#)[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)[Español](#)

FASTA

Leishmania tropica Nes-H3 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: LC650028.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>LC650028.1 Leishmania tropica Nes-H3 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence
CTGGATCATTTTCCGATGATTACACAAAAACATATACAAAAACCTGGGGAGGCCTATCTTTCTAATA
GAGAGAGACCTTTCCACATACACCAGCAGCAAGAGCTTCATACTCAAAACACGTTTGCGATAAAAAAG
GCCGATCGACGTTAACACGCCGCGTATACAAAAACGCAAAAGCGTCCGTTTATGTATATATATATATA
TACGGCGTTTCCGTTTTGGCGGTGTGTGTGGATGACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTT
GGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCGATAAGTGGTATCAA
```

الملحق (6)

9/11/21, 10:37 PM

Leishmania tropica Nes-H3 DNA, internal transcribed spacer 1, partial - Nucleotide - NCBI

Nucleotide ▾

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)[Research information \(NIH\)](#)[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)[Español](#)

GenBank

Leishmania tropica Nes-H3 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: LC650028.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS LC650028 330 bp DNA linear INV 08-SEP-2021
 DEFINITION Leishmania tropica Nes-H3 DNA, internal transcribed spacer 1, partial sequence.
 ACCESSION LC650028
 VERSION LC650028.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Leishmania tropica
 ORGANISM [Leishmania tropica](#)
 Eukaryota; Discoba; Euglenozoa; Kinetoplastea; Metakinetoplastina; Trypanosomatida; Trypanosomatidae; Leishmaniinae; Leishmania.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Almamary, N.I. and Alhayali, H.L.
 TITLE Biomolecular Effect of synergism of thalidomide and liposomal amphotericin -B on Leishmania tropica promastigote
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 330)
 AUTHORS Almamary, N.I. and Alhayali, H.L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-SEP-2021) Contact: Nasma Idrees Almamary Biotechnology center/Al-Nahrain University/Baghdad, Biotechnology center; Mosul street, Mosul, Ninawa 09334, Iraq
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..330
 /organism="Leishmania tropica"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Nes-H3"
 /db_xref="taxon:5666"
 /country="Iraq: Mosul"
 /collection_date="2021-06-02"
 misc RNA
 <1..>330
 /product="internal transcribed spacer 1"
 ORIGIN
 1 ctggatcatt ttccgatgat tacacaaaa acatatacaa aaaacctggg gaggcctatc
 61 ttttctaata gagagagacc ttccacacat acaccagcag caaagagctt cataactcaaa
 121 caacgtttgc agtaaaaaag gccgatcgac gttaacacgc cgcgtatata aaaacgcaaa
 181 agcgtccgtt tatgtatata tatatatata tacggcggtt ccgtttttgg cgggtgtgtg
 241 gtggatgacg gctcacataa cgtgtcgca tggatgactt ggcttcctat ttcgttgaag
 301 aacgcagtaa agtgcgataa gtggtatcaa
 //



To whom it may be concerned

Congratulations, Nasma I. Al-Mamary, Haitham L. Al-Hayali

As a result of the reviews and revisions, we are pleased to inform you that your followings papers:

Effect of Synergism of Thalidomide and Liposomal Amphotericin-B on *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani* Promastigote. has been formally accepted for publication in Revista Bionatura (www.revistabionatura.com) with some minor modifications in the next edition of Bionatura in 2022, one month before it will be published in the online first version, and you will have the possibility to accept it as is or make any changes.

Your prompt review and return of these page proofs will facilitate the publication of your work. We look forward to publishing your work in the Journal.



NELSON
FRANCISCO
SANTIAGO VISPO

Dr. Nelson Santiago Vispo

Editor Revista Bionatura

www.revistabionatura.com

Móvil. +593 996811111

Email. editor@revistabionatura.com

La Revista Bionatura se encuentra indexada en el

[Directory of Open Access Journals \(DOAJ\)](#) y [Latindex](#)

<https://www.facebook.com/bionaturajournal/> v <https://twitter.com/rbionatura>



Life Sciences Magazine
Bionatura
@rbionatura <http://revistabionatura.com>



Summary:

The present study drives the poisonous effect of the liposomal amphotericin B, thalidomide and synergism between them on *L. tropica* and *L. donovani* promastigote then found the inhibitory concentration 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀) at loge phase 72 hours.

The 50% inhibitory concentration ranged of thalidomide treatment from (10-12.5) µg/ml and of liposomal amphotericin B (5) µg/ml and 90% inhibitory concentration of thalidomide (25-30) µg/ml but liposomal amphotericin B (20-25) µg/ml for both *L. tropica* and *L. donovani* when the synergism ranged from (2.5 + 0.5) and (2.5 +2) µg/ml of *L. tropica* and *L. donovani* at loge phase 72 hours.

Additionally, the results had indicated that liposomal amphotericin B, thalidomide and synergism between them affected the generations number by (0.52-3.98) and (0.25-4.19) generations of *L. tropica* and *L. donovani* promastigotes respectively, as well (1.89-5.69), (1.40-5.80) generations for the synergism treatment at (24, 48, 72, 96) hours.

Moreover, observe increases in generation time with increasing of concentration. The ranged had (24-68) hours for *L. tropica*, (22-65) hours for *L. donovani* and for the synergism treatment was (12-17) hours for *L. tropica*, (11-18) hours for *L. donovani*.

Likewise demonstrated that the synergism treatment caused a marked change in promastigote morphology from spindle to oval, spherical, irregular and decomposing from in addition to change in the flagellum shape or even lost it.

On the other hand, the toxicity of the two drugs was determined by conducting an examination of the median lethal dose on albino rats. It was 4870 mg/kg for thalidomide and 3322 mg/kg for liposomal amphotericin B whereas the synergism result was 3267 mg/kg for thalidomide and 1887 mg/kg for liposomal amphotericin B.

B

Furthermore, the synergistic effect at the molecular level was studied by affecting on a number of genes for both types of parasites at the log phase, the results of electrophoresis of amplification product (*ITS1*) Internal Transcribed Spacer 1 for (CL) Cutaneous Leishmaniasis and (VL) Visceral Leishmaniasis showed agreement with the main bands of all samples used cutaneous T (C, 5, 10, 0.5+2.5, 2+2.5) and visceral D (C, 5, 12.5 1+2.5, 2+2.5) $\mu\text{g/ml}$ at the standard band 322 bp indicating that it belongs to the genus leishmania.

The (*KMPH*) Kinetoplastid Membrane Protein II gene amplification product mentioned a discrepancy in hetero packages bundles (4, 5) for *L. tropica* and (9, 10) for *L. donovani*. That is, the occurrence of inhibition by the synergistic drugs, and this is evidence of limiting the process of kinetoplast doubling, cell growth, limiting their parasites movement and reducing the flagella number.

Whereas the results of amplification of the (*ND1*) NADH Dehydrogenase gene showed genetic variation in the packets (4, 5) and (9, 10) of the two types of leishmania CL and VL respectively, this indicates that the effect of synergistic drug is on the energy production process, and as a result the activity of parasite is reduced or inhibition of cellular metabolism of mitochondria may occur, this limiting their proliferation and numbers.

It is worthy to mention that the evolutionary form all drug treatments and control samples has been proven by the tree shape and the presence of some concordances, as well as genetic variations which have been recorded in (NCBI) National Center Biotechnology Information, for the cutaneous leishmaniasis parasites, and this demonstrates that all concentrations especially the synergistic ones, were successful in inhibiting the two types of leishmania a limiting its growth. Additionally, may conceder *KMPH* and *ND1* as a good target for therapeutic effects.

University of Mosul
College of Sciences



**Biochemical and Molecular Study for the Effect of
Liposomal Amphotericin B and Thalidomide Synergisem
to Treat Cutaneous and Visceral Leishmania *In vitro***

A Thesis Submitted By

Nasma Idrees Salih Abd Al-kader Al-Mamary

To

The Council of the College of Science University of Mosul

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master

In

Biology / Zoology

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Haitham Luqman Al-Hayali

1443 A. H.

2022 A. D.

University of Mosul
College of Sciences



**Biochemical and Molecular Study for the Effect of
Liposomal Amphotericin B and Thalidomide Synergisem
to Treat Cutaneous and Visceral Leishmania *In vitro***

Nasma Idrees Salih Abd Al-kader Al-Mamary

Master thesis

Biology / Zoology

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Haitham Luqman Al-Hayali

1443 A. H.

2022 A. D.