# הקדמה

מטרת מחקר זה היא להעריך את הרגישות של *L. Tropica* לטיפול בפרומומיצין (לשקוטן) ובסודיום סטיבוגלוקונט (פנטוסטם) במעבדה.

**שיטות:** 18 דגימות קפואות של טפילי *L. tropica* הופשרו ותורבתו בצורת הפרומסטיגוט. נערכו בדיקות רגישות לפרומומיצין (לשקוטן) ולסודיום סטיבוגלוקונט (פנטוסטם) באמצעות ניתוח הפעילות המטבולית של הטפיל (סמן לחיוניות הטפיל) והיעילות של שני הטיפולים. פעילות זו נמדדה בשיטות כרומטוגרפיות.

**תוצאות:** רק 11 מתוך 18 הדגימות של *L. tropica* התרבו בהצלחה, והגיעו לריכוזים נאותים. עקב מספרן הקטן של הדגימות שתורבתו לא ניתן היה לערוך השוואה שתניב מובהקות סטטיסטית. הנתונים הראו שבאופן כללי *L. tropica* היה רגיש יותר לפרומומיצין מאשר לסודיום סטיבוגלוקונט.

**דיון:** מטרת מחקר זה הייתה להעריך את הרגישות של *L. tropica* לטיפול בפרומומיצין ובסודיום סטיבוגלוקונט במעבדה, ולקבוע אם *L. tropica* רגיש יותר לפרומומיצין או לסודיום סטיבוגלוקונט במעבדה. הניסיון הקליני הוכיח שלטפיל *L. tropica* הייתה עמידות גבוהה יותר לטיפול בפרומומיצין מאשר לטיפול בסודיום סטיבוגלוקונט. עם זאת, ממצאינו היו הפוכים. עבודה זו מדגישה את הצורך לערוך את בדיקות הרגישות לפרומומיצין של *L. tropica* כאשר טפיל זה נמצא בצורת האמסטיגוט.

## מבוא ללישמניה:

## אפידמיולוגיה

שיעור ההיארעות העולמי של מגוון הצורות של לישמניאזיס הוא 12 מיליון מקרים בשנה, בעוד שיעור ההימצאות של לישמניאזיס של העור מגיע עד 2 מיליון מקרים בשנה. בשנים האחרונות עלתה ההימצאות של לישמניאזיס עקב מספר גורמים, שהחשובים מביניהם הם כניסת בני אדם לבתי הגידול של החיות נשאיות הטפילים למטרות מגורים או כחלק ממצבים פוליטיים באזורים מסוימים, ובחלק מהאזורים, כניסת בני אדם לאזור במסגרת הגירה המונית.

לישמניאזיס של העור נמצאת בדרך כלל באזורים טרופיים ותת-טרופיים, ומינים מסוימים אנדמיים לאזורים גיאוגרפיים ספציפיים. לישמניאזיס של העור סווגה מבחינה גיאוגרפית בתור לישמניאזיס של "העולם הישן", המופיעה בדרך כלל במדינות כמו אפגניסטן, אלג'יריה, אתיופיה, עירק, איראן, ערב הסעודית ומדינות אחרות במזרח התיכון, ולישמניאזיס של "העולם החדש", המופיעה בדרך כלל בברזיל, מקסיקו, בוליביה ופרו.

המינים האחראים ללישמניאזיס של העור של העולם הישן כוללים את *L. major*, *L. tropica* ו-*L. aethiopica*, בעוד לישמניאזיס של האיברים הפנימיים בעולם הישן נגרמת בעיקר על-ידי *L. infantum* ו-*L. donovani*, שלעתים נדירות עלולים לגרום גם ללישמניאזיס של הריריות. לישמניאזיס של העולם החדש מסווגת ללישמניאזיס של הריריות וללישמניאזיס של האיברים הפנימיים. לישמניאזיס של הריריות נגרמת על-ידי *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis* ו-*L. chagasi.*

## פתוגנזה

### נשאים:

לישמניה מועברת על-ידי קבוצת נשאים פרוקי רגליים, הנקראים זבובי חול. נקבת זבוב החול, שבעולם הישן שייכת למין בקה (Phlebotomus) ובעולם החדש שייכת למין לוצומיה (Lutzomyia), היא הנשא היחיד המעביר לישמניאזיס. תשעים ושלושה מתוך כ-800 המינים המוכרים של זבוב החול מפיצים לישמניאזיס. זבוב החול מוצץ הדם שייך למערכת פרוקי הרגליים, אורכו 2–3 מ"מ, הוא אינו משמיע קול, וצבעו נע בין שחור ללבן. מידתו הקטנה מאפשרת לו לעבור דרך רשתות נגד חרקים. עם זאת, הוא רגיש מאוד לקוטלי חרקים. זבובי החול הם חרקים שעפים למרחקים קצרים, ומסוגלים לעוף למרחק של מאות מטרים ספורים בלבד מאזור הרבייה שלהם.

בתי הגידול של זבובים אלה מגוונים וביניהם מדבריות, יערות גשם, מישורים ואזורי גבעות.

### חיות מאגר

רוב מיני הלישמניה הם זואופיליים וחיות המאגר העיקריות המשמשות את מיני הלישמניה הן חיות בר כמו מכרסמים, שפני בר וחיות כיס, וכן חיות בית כמו כלבים.

לישמניאזיס של העור מופיעה בבני אדם כאשר אדם נכנס לבית גידול טבעי של זבובי חול נגועים ונעקץ על-ידם. בדיקות שנערכו לאנשים החיים באזורים אנדמיים הניבו תשובה חיובית לתבחין עור בקרב 10–32% מהאוכלוסייה. תבחין העור, הנערך בצורה דומה לתבחין טוברקולין, מלמד על חשיפה לטפיל.

זיהוי של חיות נגועות וטיפול בהן עשוי להוות אמצעי יעיל לשליטה במחלה.

### מחזור חיים:

מחזור החיים המלא של טפיל הלישמניה כולל שלב שבו הטפיל נמצא בחיית מאגר (יונק) ושלב שבו הוא נמצא בנשא (זבוב חול). באופן כללי יש לטפיל שתי צורות עיקריות: פרומסטיגוט ואמסטיגוט.

 צורת הפרומסטיגוט היא השלב שבו הטפיל חי בתוך זבוב החול בתור טפיל חוץ-תאי עם שוטון בר-תנועה אופייני, בעוד צורת האמסטיגוט התוך-תאית מופיעה כאשר הטפיל נמצא ביונקים, ולצורה זו אין שוטון.

נקבת זבוב החול נדבקת בצורת האמסטיגוט כאשר היא ניזונה מדם של יונקים נגועים. כאשר הטפיל נמצא בקיבה האחורית של הזבוב הוא עובר לצורת הפרומסטיגוט ומתחיל להתרבות במהירות. במהלך שלב זה הטפיל דוחף את עצמו לקיבה הקדמית, ומשם מוזרק לתוך המאחסן החדש בזמן הארוחה הבאה של זבוב החול.

### **התבטאויות קליניות של לישמניאזיס של העור:**

ההתבטאות של לישמניאזיס של העור של העולם הישן מתחילה כנגע מחוטט (פפולה) בקוטר 3–5 מ"מ, הגדל במהלך שבועות עד חודשים והופך לקשרית (נודולה) בקוטר 3–5 ס"מ עם גלד מרכזי שמתחתיו נמצא כיב יבש ונוקשה. ההחלמה נמשכת מספר חודשים עד שנים, בהתאם למין הטפיל ולחסינות המאחסן. הנגע עלול להותיר צלקת ושינויים קבועים בפיגמנטציה של העור.

תקופת הדגירה, ההתייצגות הקלינית של הנגעים ומהירות ההתפתחות תלויים במין שאליו משתייך טפיל הלישמניה. למשל, תקופת הדגירה של *L. major* היא 2–8 שבועות אחרי העקיצה, בעוד תקופת הדגירה של *L. tropica* ארוכה בהרבה ונמשכת אף 8 חודשים.

### **טיפול:**

בספרות נרשמו אפשרויות רבות לטיפול בלישמניאזיס של העור. עם זאת, בדרך כלל הן מבוססות על מחקרים שכללו רק מספר קטן של מקרים, עם מספר מוגבל מאוד של ניסויים כפולי סמיות. לעתים קרובות הרופאים חייבים לטפל באמצעות טיפולים, מינונים ומשכי טיפול המתאימים למקומות גיאוגרפיים שונים לגמרי, ולפעמים אף מיועדים למינים שונים מאלה שנחקרו בעבר. עקב כך נראים שיעורי תגובה לא עקביים.

אפשרויות הטיפול הזמינות כוללות טיפולים מקומיים, טיפולים תוך-נגעיים וטיפולים מערכתיים:

 טיפול מקומי/תוך-נגעי: סודיום סטיבוגלוקונט (תוך-נגעי), פרומומיצין, אימיקימוד, קריותרפיה, אלקטרותרפיה, תרמותרפיה וטיפול פוטודינמי.

טיפול מערכתי: אנטימון חמש-ערכי, סודיום סטיבוגלוקונט, מגלומין אנטימונייט, הקסדצילפוספוכולין, אמפותריצין B, פנטמידין, דפסון, אזולים.

היו דיווחים על עמידות לרוב הטיפולים האלה.

המחקר הנוכחי מתמקד בטיפול ב-*L. tropica* באמצעות סודיום סטיבוגלוקונט והאנטיביוטיקה פרומומיצין, טיפול שפותח על-ידי קבוצה ישראלית בשיתוף פעולה עם המרכז הרפואי הדסה והמחלקה לפרזיטולוגיה באוניברסיטה העברית בירושלים. הכנה מקומית זו נחשבת יעילה במיוחד נגד *L. major* ופחות יעילה נגד *L. tropica* מאשר סודיום סטיבוגלוקונט.

## מטרות:

 לבדוק את הרגישות של *L. tropica* לטיפול בפרומומיצין (לשקוטן) ובסודיום סטיבוגלוקונט (פנטוסטם) במעבדה.

## שיטות:

### טפילים:

הטפילים נלקחו מדגימות מעבדה קפואות שנלקחו מנגעים של מטופלים שאובחנה אצלם לישמניאזיס של העור, מאזור מעלה אדומים הידוע כאזור גאוגרפי אנדמי של *L. tropica*. הדגימות הופשרו, והטפילים תורבתו במדיום מתאים בטמפרטורה של 26 מעלות צלסיוס, עד שריכוזם הגיע ל-2 × 107 פרומסטיגוטים למ"ל.

### מדיום הגידול:

ל-Medium-199 (Sigma-Aldrich, סנט לואיס, מיזורי, ארה"ב) הוספו 2 מילימולר של L-גלוטמין, 100 פיקומולר אדנוזין, 23 פיקומולר חומצה פולית, אנטיביוטיקה (100 יחב"ל פניצילין G ו-100 פיקוגרם/מ"ל סטרפטומיצין), 1 תערובת ויטמינים BME, 25 מילימולר 2-(N-מורפולינו) חומצה אתנסולפונית (MES), 4.2 מילימולר NaHC03 וכן נסיוב עובר עגל משופעל בחום (FCS, 10% נפח לנפח) מותאם לחומציות של pH 6.8.

### בדיקות רגישות:

בדיקות של רגישות הפרומסטיגוטים נערכו באמצעות ניתוח הפעילות המטבולית של הטפיל. הפעילות המטבולית היא סמן לחיוניות הטפיל, ולכן מלמדת על יעילות הטיפול. הפעילות המטבולית נמדדה באמצעות כרומטוגרפיה עם המדיומים הבאים:

1. מדיום גידול (פשוט) – בקרה
2. מדיום גידול עם פרומסטיגוטים – הוגדר כמייצג פעילות מטבולית מלאה של האורגניזם
3. מדיום גידול עם פרומסטיגוטים ואמפותריצין B – מייצג דיכוי מלא של פעילות הנגיף
4. מדיום גידול, פרומסטיגוטים, וחמישה ריכוזים שונים של פרומומיצין, כדי לחשב את אחוז הדיכוי של הפעילות המטבולית של הנגיף.
5. מדיום גידול, פרומסטיגוטים, וחמישה ריכוזים שונים של סודיום סטיבוגלוקונט, כדי לחשב את אחוז הדיכוי של הפעילות המטבולית של הנגיף.

כל צלחת גידול הייתה בעלת שלושה תאים שונים, סידור המאפשר מדידה מדויקת יותר ופועל בתור בקרה נוספת בניסוי.

### חישוב אחוז הדיכוי:

אחוז הדיכוי של הטפיל עבור כל אחד מריכוזי הפרומומיצין חושב באמצעות הנוסחה הבאה:

Y = [(k-y)/k] \* 100

מתוך החישוב הזה ניתן היה לחשב את EC50 (מחצית הריכוז היעיל המרבי) עבור דגימה מסוימת. טפיל עם EC50 גבוה במובהק נחשב עמיד לפרומומיצין.

## תוצאות:

18 דגימות של *L. tropica* (שההתייחסות אליהן נעשית לפי המינים הנמצאים באותו מיקום גאוגרפי שהוא מעלה אדומים, ודגימה אחת מהכרמל, ולא לפי PCR) הופשרו ותורבתו במדיום מתאים. רק 11 דגימות גודלו בהצלחה והגיעו לריכוזים מתאימים של 2 × 107 פרומסטיגוטים לכל מ"ל.

בטבלה הבאה מפורטות תוצאות בדיקות הרגישות של *L. tropica* לפרומומיצין ולסודיום סטיבוגלוקונט, המבוטאות בערכים של EC50. ככל שערך EC50 נמוך יותר, כך גבוהה רגישות הטיפול. הרגישות של *L. tropica* לפרומומיצין נעה בין 250 ל-17 ולסודיום סטיבוגלוקונט בין 250 ל-22. ברוב הדגימות נמצאה רגישות לפרומומיצין, ולגבי 8 מינים נמצא EC50 נמוך במינים שטופלו בפרומומיצין לעומת שתי דגימות עם EC50 נמוך בזנים שטופלו בסודיום סטיבוגלוקונט. בדגימה אחת נמצא ערך EC50 זהה בשני הטיפולים.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | מין | מיקום גאוגרפי | EC50 של סודיום סטיבוגלוקונט (פנטוסטם) | EC50 של פרומומיצין (לשקוטן) |
| 1 | ***L1638*** | כרמל | 67 | 18 |
| 2 | ***L1504*** | מעלה אדומים | 55 | 56 |
| 3 | ***L1534*** | מעלה אדומים | 69 | 48 |
| 4 | ***L1566*** | מעלה אדומים | 53 | 17 |
| 5 | ***L1567*** | מעלה אדומים | 60 | 30 |
| 6 | **L1559** | מעלה אדומים | 170.6 | 76.9 |
| 7 | **L1579** | מעלה אדומים | > 250 | 152.1 |
| 8 | **L1601** | מעלה אדומים | 92.91 | 33.17 |
| 9 | **L1607** | מעלה אדומים | > 250 | > 250 |
| 10 | **L1623** | מעלה אדומים | 22 | > 27 |
| 11 | **L1558** | מעלה אדומים | > 80 | 68.96 |

## דיון:

מטרת מחקר זה הייתה להעריך את הרגישות של *L. tropica* לטיפול בפרומומיצין ובסודיום סטיבוגלוקונט במעבדה.

ניסיון קליני קודם הראה שיעורים גבוהים יותר של עמידות של *L. tropica* לפרומומיצין, לעומת טיפול בסודיום סטיבוגלוקונט, בעוד התוצאות שהתקבלו במחקרנו היו הפוכות. הדבר מצביע על כך שאין מתאם טוב בין תוצאות בדיקות רגישות מעבדתיות לבין רגישות הטפיל לפרומומיצין, בדומה למסקנותיהם של חוקרים אחרים אשר בדקו את הרגישות של *L. donovani* לטיפול בסודיום סטיבוגלוקונט (פנטוסטם) במעבדה ואת הרגישות של *L. major* לפרומומיצין (לשקוטן).

הסבר אפשרי לחוסר העקביות בין ממצאי המעבדה לרגישות בפועל של הטפיל לפרומומיצין ולסודיום סטיבוגלוקונט הוא הסביבה השונה של הטפיל בתוך המאחסן, סביבה שפועלת בה מערכת חיסון שאינה נמצאת בבדיקות הנערכות במעבדה. בנוסף, בדיקות המעבדה הן בדיקות *in vitro* שנערכו על צורת הפרומסטיגוט של הטפיל, בעוד *in vivo* הטפיל קיים בתור אמסטיגוט תוך-תאי. דרישות הגידול ומדידת הרגישות לטיפול של צורות האמסטיגוט הן בעייתיות. השיטה לבדיקת רגישות האמסטיגוטים לטיפול היא להדביק מקרופגים בפרומסטיגוטים. עם זאת, תוצאות אלה עשויות להיות מושפעות ממספר גורמים, כמו השונות הנרחבת ביכולת הטפילים להדביק מקרופגים ולהתרבות בתוכם. בשל כך, לא מתאים להשתמש בשיטה זו. ניסיונות שנעשו בשנים האחרונות לשפר את השיטות האלה לא צלחו. שיקולים אלה הובילו אותנו לבחור בשיטה חלופית לבדיקה של צורת האמסטיגוט. בחרנו לבדוק את הרגישות של *L. tropica* לפרומומיצין ולסודיום סטיבוגלוקונט כאשר הוא נמצא בצורת הפרומסטיגוט. חשיבותה של עבודה זו היא בהדגשת ערכה של בדיקת הטפיל בצורת האמסטיגוט, ופיתוח שיטות אלה לבדיקות רגישות טובות יותר של לישמניה.