ایمونوپارازیتولوژی اثرات ضد لیشمانیایی داروی ASA در موش‌های Balb/c حساس به لیشمانیا ماژور از طریق مکانیسم‌های NO و CRP

مریم جلالیان[۱]، حسین نهروانیان*[۲]، مهدی آسمار[۳]، احمدرضا اسماعیلی رستاقی[۴]، مهین فرهمند[۵]، مرضیه امینی[۶]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲*، ۳، ۴، ۵و ۶ - انستیتو پاستور ایران، بخش انگل شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

mobcghn@pasteur.ac.ir

چکیده

یکی از بیماری‌های شایع پوستی که در بسیاری از نقاط دنیا انتشار دارد لیشمانیوز می‌باشد. انتقال توسط نیش پشه خاکی آلوده صورت می‌گیرد، و بیماری به وسیله تک‌یاخته داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا ایجاد شده و در ماکروفاژها تکثیر می‌یابد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر ضد لیشمانیایی داروی ASA در موش‌های حساس Balb/c، از طریق نقش آنتی اکسیدانی آن با القای واسطه‌های ایمنی همچون نیتریک اکساید (NO)، تغییر الگوی القای پروتئین واکنشی سی (CRP) در میزبان، ارزیابی ممانعت از احشایی شدن انگل و تأثیر آن با التیام زخم لیشمانیا (اندازه زخم و طول دوره بیماری) و همچنین تأثیر دارو بر میزان تکثیر انگل در ماکروفاژها می باشد. ابتدا به دو طریق خوراکی (گاواژ) و تزریق صفاقی (ip)، ASA را به صورت محلول به موش‌ها تلقیح کردیم و نتیجه گرفتیم که شکل خوراکی نسبت به روش تزریقی پاسخ بهتری را بهمراه خواهد داشت. در این مطالعه ۴۰ موش همخون Balb/c در دو گروه ۲۰ تایی آلوده به لیشمانیا و سالم (۱۰ موش در هر زیرگروه آزمون و شاهد) مورد استفاده قرار گرفتند و پس از هشت هفته که در موش‌ها زخم دیده شد به مدت دو هفته به وسیله گاواژ، ASA محلول در اتانول به گروه آزمون و حلال دارویی (سرم فیزیولوژی و الکل) به گروه شاهد تلقیح شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ASA قادر به ایجاد اثرات محدود ضد لیشمانیایی از طریق تغییر فاکتورهای ایمنی و التهابی NO و CRP بر روی موش‌های حساس Balb/c آلوده به *L. major* شده است. هم چنین، به کارگیری ASA باعث کاهش درصد احشایی شدن انگل در اندام‌های هدف و تکثیر آماستیگوت‌ها در داخل ماکروفاژها شده است، در حالی‌که در اندازه زخم لیشمانیایی، میزان درصد بقا، هپاتومگالی و اسپلنومگالی تأثیر چندانی نداشته است.

کلمات کلیدی: ASA، Balb/c، لیشمانیا ماژور، نیتریک اکساید، NO، CRP.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوز بیماری جلدی حاصل از انگل لیشمانیا است. لیشمانیوز جلدی دومین بیماری شایعی است که به وسیله حشرات منتقل می‌شود و در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان دیده شده است. حدود ۸۸ کشور جهان به لیشمانیوز جلدی آلوده هستند و در ایران سالانه حدود ۳۰۰۰ نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند. شاید بتوان آن را مهمترین بیماری انگلی بعد از مالاریا در کشور دانست (۳). انگل جنس لیشمانیا به وسیله پشه خاکی از جنس فلوبوتوموس انتقال می‌یابد، ۹۰٪ لیشمانیوز پوستی در چند کشور افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه رخ می‌دهد (۲۷). مطالعات زیادی در مورد لیشمانیوز پوستی در مدل موشی صورت گرفته و مشخص شده است که موش های Balb/c مدل حساس و موش های C57bl/b مدل مقاوم به انگل می باشند (۱۰). انگل‌های لیشمانیا در پستانداران، بند پایان، خزندگان، جوندگان و گوشتخواران دیده می‌شوند و به دو شکل تاژک‌دار و بی‌تاژک می باشند (۲). انگل دارای دو شکل جداگانه در ناقل و در بدن میزبان مهره دار دارد، بطوری که در بدن پشه به شکل تاژکدار (پروماستیگوت) و در بدن انسان به شکل بدون تاژک (آماستیگوت) یافت می‌شود (۱).

نیتریک اکساید

NO از تبدیل L–Arginine به L-Citruline با واسطه نیتریک اکساید سنتاز (NOS) در حضور کوفاکتور نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADPH) تشکیل می‌شود (۲۵). NO یک مولکول بیولوژیک تنظیم کننده مهم سیستم‌های عصبی، ایمنی و قلبی عروقی می‌باشد (۱۰). یافته‌های اخیر، حاکی از آن است که NO یک محرک قوی سیستم ایمنی بوده و در طی عفونت، التهاب و دفع پیوند نقش‌های متنوعی دارد و به عنوان یک مولکول مهم که به طور همزمان در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و میزان بقای آن دخالت دارد (۱۳و۱۵). از طرفی NO به عنوان یک مولکول تنظیمی مهم روی سیستم ایمنی و یک مدیاتور سیتوتوکسیک اصلی تأثیرگذار در مسیر ایمنی شناخته شده است و به صورت یک مولکول پیام دهنده و تنظیم کننده در فعالیت‌های سلولی نقش مهمی را بازی می‌کند (۱۶). در حال حاضر وجود NO در سلول‌ها و بافت‌های مختلف مثل سلول‌های اندوتلیال عروق، نرون‌ها، پلاکت‌ها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های آدرنال، سلول‌های اپیتلیال تنفسی، فیبروپلاست‌ها، سلول‌های ماهیچه و هپاتوسیت‌ها به علاوه در ماکروفاژهای فعال شده به عنوان یک مولکول اثرگذار سیتوتوکسیک و سیتواستاتیک به اثبات رسیده است (۲۱). NO عمدتا توسط ماکروفاژها تولید و توسط NO-donor و NO-inducer القا می‌شود (۱۵). NO در رشد و عمل عوامل مختلف که باعث بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس ها و انگل ها اثرگذار است (۲۶).

Acetyl salicylic acid (ASA)

از داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی می‌باشد که به صورت شایع مورد استفاده قرار می گیرد. ASA از ترکیبات قدیمی ضد درد و ضد التهاب می‌باشد و اکثراً به شکل خوراکی در بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. تاریخچه استفاده از ASA به مصر باستان بر می‌گردد (۲۵).

Archive of SID

www.SID.ir

ASA سریعاً و به طور کامل از مجاری گوارشی جذب و هیدرولیز شده و به سالیسیلات تبدیل می‌شود. به وسیله مهار سنتز پروستاگلاندین اثر تسکینی و ضد التهابی ایجاد کرده پاسخ التهابی و شدت محرک درد وارده به پایانه‌های عصبی حسی را کاهش می‌دهد، اثر تب بری به وسیله اثرات دارو بر هیپوتالاموس ایجاد می‌شود که اتساع عروقی ایجاد کرده و بنابراین دمای بدن را کاهش می‌هد، از طرفی تجمع پلاکتی را نیز مهار می‌کند (۴). یکی از مهمترین مکانیزم‌های ASA ممانعت از تجمع پلاکت‌ها می‌باشد (۲۲). بعد از صد سال درمان با ASA مکانیزم‌های مختلف شامل فعالیت درمانی و واکنش‌های بالینی متفاوت در بیماران حساس به ASA و یا داروهای غیر التهابی غیراستروئیدی مشاهده شده است. ASA موجب القای واکنش‌های ایمنی هومورال (IgE/IgG) و سلولی (لمفوسیت‌های)، ممانعت از مسیر سیکلواکسیژناز و فعال‌سازی سلولی (ماست سل‌ها، بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و پلاکت‌ها) و افزایش سطحح آلبومین خون و سیستم کمپلمان می‌شود (۲۰).

(CRP) C-Reactive Protein

یک پروتئین فاز حاد است که با شروع القا می‌تواند تا یک هزار برابر افزایش یابد و به علت توانایی اپسونیزه کردن و فعال کردن سیستم کمپلمانی انسانی نقش مهمی در دفاع ذاتی میزبان بر علیه میکروارگانیزم‌های مختلف دارد (۹). پاسخ فاز حاد شامل تطبیق سریع ترکیب پروتئین‌های پلاسما در پاسخ به محرک‌های آسیب‌زا از قبیل عفونت به دلیل سوختگی، تروما و نئوپلاسم است. افزایش CRP، فیبرینوژن و هاپتوگلوبولین از جمله پاسخهای معمول این فاز هستند (۲۱). نقش دقیق پاسخ حاد تاکنون ناشناخته مانده است ولی تصور می‌رود که افزایش پروتئین‌های اپسونیزه کننده و آنتی پروتئینازها برای تقویت ایمنی ذاتی و محافظت در مقابل آسیب نسجی مفید باشند. CRP در سرم‌های نرمال به مقدار کم وجود دارد ولی پس از آسیب‌های بافتی، عفونت‌های باکتریال و ویروسی التهاب و بدخیمی‌ها افزایش می‌یابد که تا حدود ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر در عرض ۱۲ الی ۲۴ ساعت هم بالا می‌رود (۸، ۱۹ و ۲۳).

CRP از پنج زیر واحد پلی پپتیدی غیر گلیکوزیله مشابه و یکسان که به وسیله پیوندهای غیراشتراکی که به حالت پنتامر قرار گرفته‌اند تشکیل شده است (۱۷).

مواد و روش‌ها

این مطالعه در چهار گروه از موش‌های Balb/c شامل موش‌های سالم و آلوده (۱۰ موش در هر گروه آزمون و شاهد) انجام پذیرفت. موش‌های سالم بدون آلودگی و موش‌های آلوده مورد تزریق *L. major* قرار گرفته و بر روی موش‌های آزمون، ASA خوراکی و بر روی موش‌های شاهد، حلال دارویی (اتانل در سرم فیزیولوژی) توسط گاواژ مورد استفاده قرار گرفت.

تزریق انگل *L. major*: موش‌های همخون نر Balb/c با سن ۶-۴ هفته برای تزریق انگل مورد استفاده قرار گرفتند. ۰/۱ml از سوسپانسیون که حاوی دو میلیون پروماستیگوت انگل می‌باشد، به صورت زیر جلدی به ناحیه فاعده دم تزریق شد. پس از چند روز، در محل تزریق برآمدگی کوچکی به قطر ۱mm ظاهر شده که بعد از چند هفته به زخم نسبتاً بزرگی تبدیل گشته، متاستاز داده و حیوان کاملاً آلوده می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

گروه‌ها وآزمایشات: تعداد کل حیواناتی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت ۴۰ سر موش نر Balb/c در چهار گروه به صورت تصادفی بوده است و در فواصل زمانی معین پس از تلقیح انگل از نظر قطر زخم‌ها و وزن مورد بررسی قرار گرفتند.

۱. ۱۰ سر موش سالم به عنوان شاهد سالم تحت درمان با ۱۰۰ میکرولیتر حلال دارویی به صورت خوراکی با گاواژ.
۲. ۱۰ سر موش سالم به عنوان آزمون سالم تحت درمان با ۱۰۰ میکرولیتر ASA خوراکی به صورت خوراکی با گاواژ.
۳. ۱۰ سر موش آلوده به *L. major* به عنوان شاهد آلوده تحت درمان با ۱۰۰ میکرولیتر حلال دارویی به صورت خوراکی با گاواژ.
۴. ۱۰ سر موش آلوده به *L. major* به عنوان آزمون آلوده تحت درمان با ۱۰۰ میکرولیتر حلال دارویی به صورت خوراکی با گاواژ.

اندازه‌گیری وزن بدن: وزن بر حسب گرم پس از تلقیح انگل هر هفته، با استفاده از یک ترازوی کفه بالا اندازه‌گیری شد.

ارزیابی هپاتواسپلنومگالی: بدین منظور پس از بیهوش کردن موش‌ها به وسیله اتر و قطع نخاع، در شرایط سترون طحال، کبد و غدد لنفاوی از بدن خارج و پس از آن‌که از هر کدام گسترش فشاری تهیه شد، وزن اندام‌ها توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و به عنوان شاخص میزان هپاتو/ اسپلنومگالی بیان شد (۱۸).

اندازه‌گیری میزان بقا: Survival rate بیانگر درصد بقای موش‌های تحت درمان در هر هفته بعد از تزریق است که تفاوت‌ها به وسیله نرم‌افزار Graph Pad Prism رسم و مورد مقایسه قرار گرفت (۱۸).

اندازه‌گیری زخم: هر هفته پس از تلقیح به وسیله کولیس دیجیتال و بصورت افقی و عمودی (Dd) با زاویه قائمه نسبت به یکدیگر اندازه‌گیری و اندازه زخم بر حسب mm بر طبق فرمول (D+d)/2 محاسبه شد (۱۸).

میزان تکثیر آماستیگوت‌ها در ماکروفاژها: تکثیر انگل از طریق شمارش آماستیگوت‌ها درون ماکروفاها در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا در پایان دوره آزمایش حاصل شد. بدین شکل که ۵ ماکروفاژ را به طور تصادفی انتخاب کرده و تعداد انگل در هر کدام را شمارش نمودیم، میانگین آن‌ها نشانگر میزان تکثیر آماستیگوت‌ها درون هر ماکروفاژ است (۱۸).

آزمایشات میکروسکوپی و تهیه گسترش: تشخیص کلنیکی آماستیگوت‌ها از طریق نشان دادن انگل درون زخم و بافت‌ها، با تهیه گسترش‌های رنگ شده در پایان دوره آزمایش صورت گرفت. زخم‌ها با اتانل تمیز شد و کنار آن به وسیله یک تیغ جراحی بریده شد، سپس از ترشحات لبه بیرونی ضایعه گسترش تهیه شد (۵). گسترش‌های فشاری از کبد، طحال و غدد لنفاوی با قرار دادن یک تکه کوچک از بافت بین دو لام شیشه‌ای و کشیدن آن‌ها به دو سمت مخالف بدست آمد. گسترش‌های حاصله در هوا خشک شد به وسیله متانل تثبیت شد و برای تعیین آماستیگوت‌ها با میکروسکوپ نوری، به وسیله گیمسای ۱۰٪ رنگ‌آمیزی انجام شد (۱۶). با این روش می‌توان احشایی شدن لیشمانیوز را در بافت‌های کبد، طحال و غدد لنفاوی مشخص کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی غلظت NO در سرم خون و سوسپانسیون‌های بافتی: جهت جداسازی سرم، پس از آلودگی و بعد از دو هفته از دادن داروها، موش‌ها را با اتر بیهوش کرده و به وسیله سرنگ انسولین از قلب خونگیری نمودیم و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در سانتریفوژ قرار دادیم و سپس با سمپلر محلول رویی آن را جدا کرده بدین ترتیب سرم خون جدا می شود. به منظور تهیه سوسپانسیون از نمونه‌های بافتی بدست آمده (کبد و طحال) میزان ۰/۱ gr از بافت طحال و ۰/۲ gr از بافت کبد را جدا کرده و پس از توزین با استفاده از دستگاه هموژنایزر درون اپندورف کاملاً هموژنیزه می‌کنیم پس از افزودن ۱ cc آب مقطر استریل به آن، در نهایت سوسپانسیون حاصله را درون Shaker قرار داده تا کاملاً یکنواخت شود. کلیه سوسپانسیون‌ها و نیز نمونه‌های سرم خون حاصل از گروه‌های مختلف آزمون و شاهد را جهت سنجش نیتریک اکساید در دمای ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم برای اندازه‌گیری میزان NO از روش Griess Micro Assay استفاده می‌کنیم (۶و ۱۸).

بررسی CRP نمونه‌های سرمی: تست (LAT) Latex Agglutination Test یک تست آگلوتیناسیون روی اسلاید می‌باشد که به صورت کیفی و نیمه کیفی و برای سنجش میزان CRP در سرم‌های انسانی بکار می‌رود که در آن ذرات لاتکس با IgG anti human CRP پوشانده می‌شود و زمانی که با نمونه‌های مثبت حاوی CRP مخلوط شوند، ایجاد آگلوتیناسیون می‌کنند و در نمونه‌های منفی هیچگونه آگلوتیناسیونی دیده نمی‌شود (۱۷و۱۹). در این مطالعه، سنجش کیفی CRP با روش LAT انجام شد، ۵۰ میکرولیتر از سرم روی اسلاید کیت CRP ریخته شد و سپس ۵۰ میکرولیتر معرف حاوی ذرات لاتکس با IgG Anti Human CRP به آنها اضافه و خوب مخلوط شد، تا دو دقیقه به صورت هشت انگلیسی تکان دادیم بعد از گذشت این زمان نتیجه را به صورت وجود و یا عدم وجود آگلوتیناسیون بررسی کردیم.

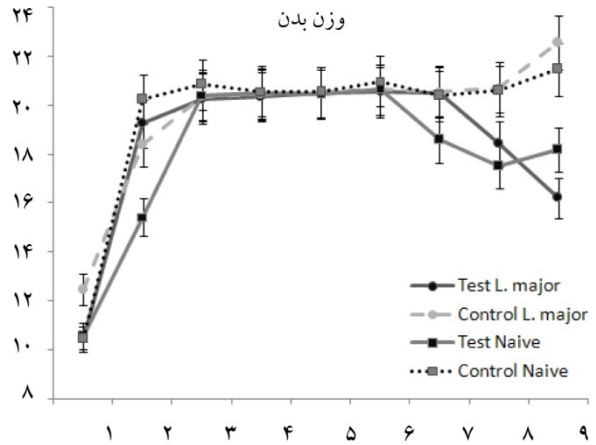
نتایج

در بررسی تأثیر ضد لیشمانیایی داروی ASA از چهار گروه Control Naïve و Test Naive به عنوان گروه‌های شاهد و آزمون سالم، *L. major* Control و *L. major* Test به عنوان گروه‌های آزمون و شاهد آلوده استفاده شد. که نتایج بدست آمده از این مطالعه به صورت زیر بوده است.

در طی آزمایش، تفاوت معنی داری در گروه آزمون آلوده در هفته هشتم دیده شد که نشان داد که داروی ASA باعث کاهش وزن شده است (نمودار ۱). از نقطه نظر ارزیابی سمیت دارو، ASA باعث کاهش هپاتومگالی در گروه آزمون سالم شده است (نمودار ۲). ضمناً دارو باعث کاهش اسپلنومگالی در گروه آزمون آلوده شده است (نمودار ۳).

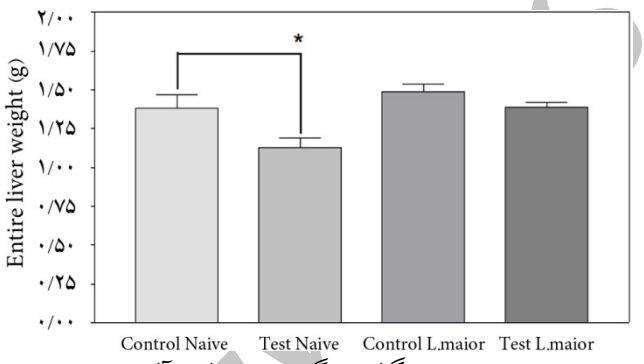
Archive of SID

www.SID.ir



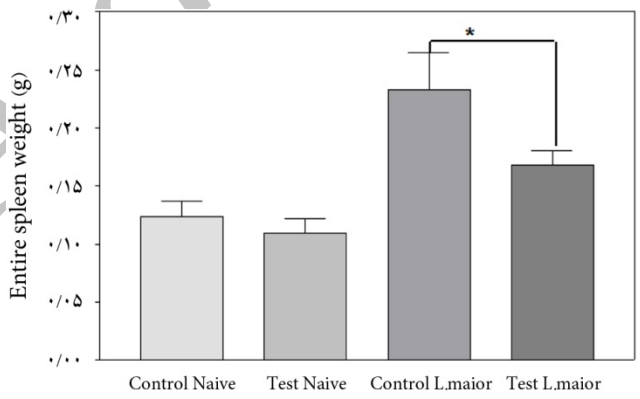
نمودار ۱: بررسی وزن بدن موش‌های آزمون و شاهد گروه آلوده به لیشمانیا و سالم

میانگین وزن بدن موش‌های Balb/c سالم و آلوده به *L. major* (ANOVA, * P < 0.05, n=5 mice/group).



نمودار ۲: بررسی هپاتومگالی در گروه‌های سالم و آلوده

میانگین وزنی کبد به گرم بیان شده است (ANOVA , *P < 0.05, n=5 mice/group).



نمودار ۳: بررسی اسپلنومگالی در گروه‌های سالم و آلوده

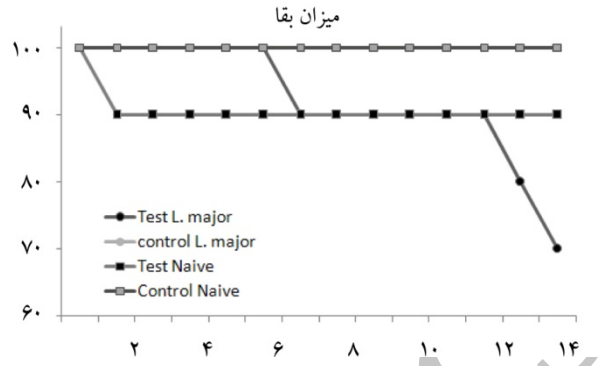
میانگین وزنی طحال به گرم بیان شده است (ANOVA , *P < 0.05, n=5 mice/group).

Archive of SID

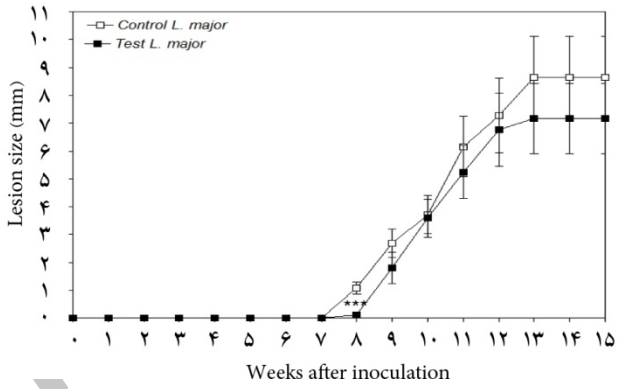
www.SID.ir

در مقایسه درصد بقای موش‌ها، تغییرات معنی‌داری در گروه‌های شاهد لیشمانیا نسبت به گروه‌های شاهد سالم مربوطه مشاهده نشد و یک کاهش جزئی در میزان بقا در گروه آزمون لیشمانیا مشاهده شد (نمودار ۴).

ضمنا آنالیز آماری داده ها از تاثیر دارو ، تفاوت معنی داری بین دو گروه از طریق کاهش اندازه زخم گروه آزمون آلوده هفته هشتم مشاهده شده است (نمودار ۵).



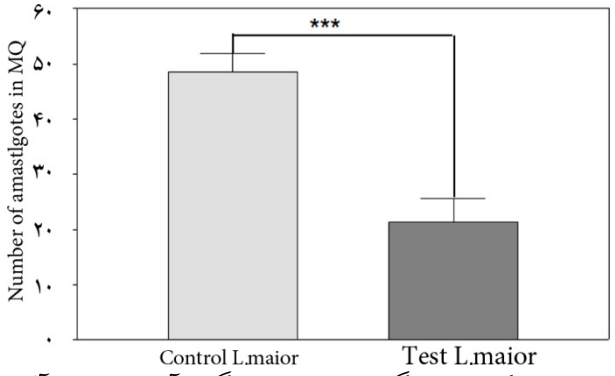
نمودار ۴: مقایسه درصد بقا در گروه‌های سالم وآلوده
میزان بقا به درصد بیان شده است (n=5 mice/group, ANOVA).



نمودار ۵: مقایسه اندازه زخم لیشمانیایی در گروه‌های آزمون و شاهد آلوده به لیشمانیا ماژور
میانگین قطر زخم بر حسب mm بیان شده است (n=5 mice/group, *** P< 0.001, Student's *t-Test*).

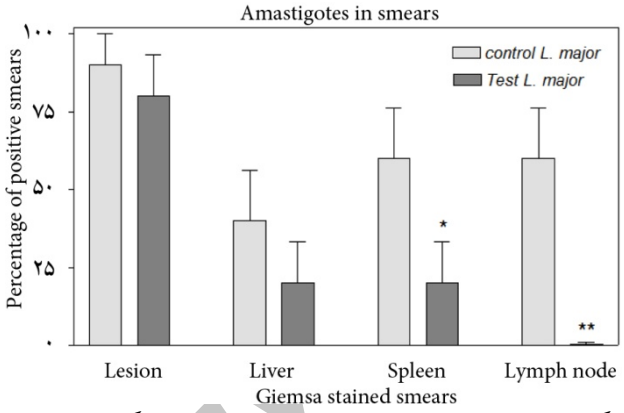
از نظر بررسی تأثیر دارو بر تکثیر آماستیگوت‌ها در ماکروفاژها نشان داد که داروی ASA موجب کاهش معنی‌دار تکثیر آماستیگوت‌ها در ماکروفاژها شده و نشان دهنده تأثیر مثبت این دارو در دراز مدت از بروز لیشمانیوز جلدی سخت می‌باشد (نمودار ۶). در بررسی درصد موارد مثبت در گسترش‌های زخم و اندام‌های هدف، هر چند که داروی ASA موجب کاهش موارد مثبت در نمونه‌های زخم و گسترش‌های کبدی شده است اما به صورت معنی‌دار نبوده است، ولی این میزان که نشان‌دهنده کاهش احشایی شدن انگل در بافت‌های طحال و غدد لنفاوی می‌باشد که در اثر داروی ASA ایجاد شده است (نمودار ۷).

www.SID.ir



نمودار ۶: تکثیر آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای گسترش زخم در دو گروه آزمون و شاهد آلوده به لیشمانیا ماژور

میانگین تکثیر آماستیگوت ها در ماکروفاژ بر حسب تعداد بیان شده است (*t-Test* Student's ,P< 0.001 ***, mice/group ,n=5)



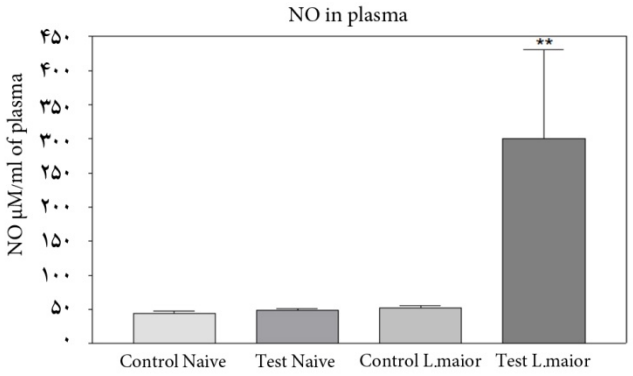
نمودار ۷: مقایسه درصد گسترش‌های مثبت زخم، کبد، طحال و غدد لنفاوی در گروه‌های شاهد و آزمون آلوده

میزان احشایی شدن انگل در گسترش‌های زخم، کبد، طحال و غدد لنفاوی بر حسب میانگین درصد موارد مثبت بیان شده اند P< 0.05 (*t-Test* Student's ,mice/group n=5) و (*t-Test* Student's ,P< 0.01 **, mice/group n=5 *).

از نظر تأثیر دارو بر فاکتورهای ایمنی و التهابی، داروی ASA موجب القای معنی‌دار NO در پلاسمای گروه آزمون لیشمانیایی شده است و احتمالاً یکی از دلایل کاهش احشایی شدن انگل القای سیستمیک NO در میزبان آلوده به لیشمانیا می‌باشد (نمودار ۸). از نظر میزان NO سوسپانسیون بافتی کبد، تفاوت معنی داری مشاهده شد به طوری که ASA باعث کاهش NO درکبد شده است (نمودار ۹). در میزان NO سوسپانسیون بافتی طحال تفاوت معنی داری در گروه ها مشاهده نشد. یعنی دارو در طحال روی NO اثری نداشته است (نمودار ۱۰).

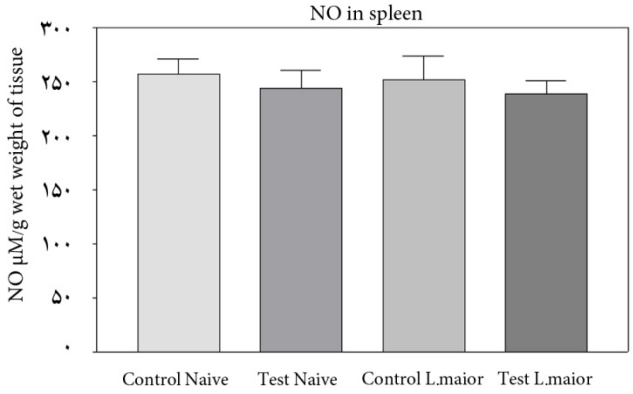
Archive of SID

www.SID.ir



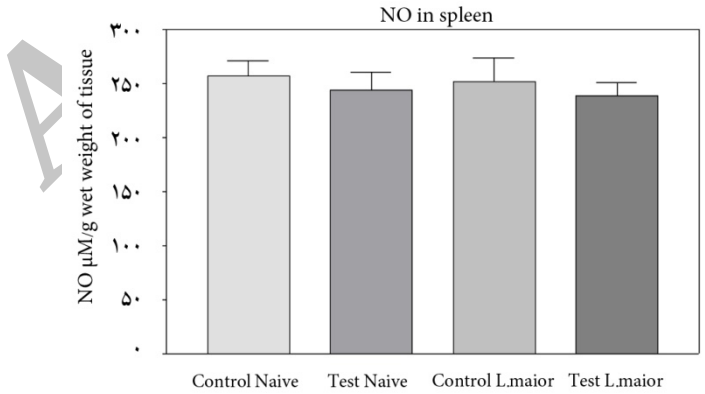
نمودار ۸: سنجش NO در نمونه‌های سرم خون موش‌های آلوده و سالم

میانگین غلظت NO بر حسب µM/ml در سرم بیان شده است (** P< 0.01, ANOVA, n=5 mice/group).



نمودار ۹: سنجش NO در نمونه‌های سوسپانسیونی بافتی کبد موش‌های آلوده و سالم

میانگین غلظت NO بر حسب µM/g در بافت بیان شده است (* P< 0.05, ANOVA, n=5 mice/group).



نمودار ۱۰: سنجش NO در نمونه‌های سوسپانسیونی بافتی طحال موش‌های آلوده و سالم

میانگین غلظت NO بر حسب µM/g در بافت بیان شده است (n=5, mice/group, ANOVA).

www.SID.ir

پاسخ التهابی CRP: پس از گذشت مدت زمان معین در هیچ کدام از اسلایدهای کیت CRP آگلوتیناسیونی مشاهده نشد.

بحث

به دلیل اهمیت و گسترش لیشمانیوز پوستی، مطالعات زیادی بر روی عامل بیماری، درمان، فاکتورهای ایمنی و غیره صورت پذیرفته است. بلام و همکاران به بررسی درمان لیشمانیوز پوستی در میان مسافران مطالعه‌ای داشته‌اند (۱۲). مهاجری و همکاران بر روی ارزیابی سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th1و Th2 و در مبتلایان به لیشمانیوز پوستی حساس و مقاوم به درمان با گلوکانتین مطالعاتی داشته‌اند (۶). فرج‌نیا و همکاران نیز، بیان و ارزیابی ایمونولوژیک پروتئین p64 لیشمانیا ماژور تحقیقاتی انجام داده‌اند (۳). همچنین هاشمی و همکاران در تهیه نقشه پروتئینی تکرارپذیر فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور توسط الکتروفورز سه بعدی کار کرده‌اند (۷). ما نیز در این مطالعه از یک داروی ضد التهابی غیر استروئیدی برای بررسی فاکتورهای ایمنی و التهابی استفاده نمودیم. از نظر تاثیر دارو بر فاکتورهای ایمنی و التهابی، داروی ASA موجب القای معنی دار NO در پلاسما شده است و احتمالا یکی از دلایل کاهش احشایی شدن انگل، القای سیستمیک NO در میزبان آلوده به لیشمانیا می باشد. در حالی که میزان NO در سوسپانسیون کبدی در گروه آزمون لیشمانیایی نسبت به شاهد سالم کاهش نسبی پیدا کرد، ولی هیچگونه تغییری معنی داری در میزان NO در سوسپانسیون بافت طحال مشاهده نشد. با توجه به عدم تغییر میزان CRP به نظر می رسد که ASA بر فاکتورهای التهابی تاثیر ندارد. داروی ASA یا استیل سالیسیلیک اسید باعث کاهش احشایی شدن انگل در بافت‌های هدف شده و همچنین باعث افزایش فاکتور ایمنی (NO) و کاهش میزان فاکتور التهابی (CRP) در لیشمانیوز پوستی شده است. بنابراین می‌توان از این دارو به عنوان، داروی ضد التهاب در کاهش عوارض لیشمانیوز پوستی استفاده نمود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی شماره ۴۵۱ مصوب انستیتو پاستور ایران می باشد که بصورت پایان نامه دانشجویی اجرا شده است. ضمنا از کلیه کارکنان بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران به ویژه خانم‌ها نعیمی و سلیمانی و آقایان رحمانی و اسفندیاری که ما را در انجام این مطالعه یاری فرمودند کمال تشکر را داریم.

منابع

۱. اختیاری، ح.؛ شاهی، ب.؛ محمدی، م.؛ خانی، ف.؛ لطفی، ب. و حاج سید جوادی، ا.، ۱۳۸۴. اصول انگل شناسی براون – نووا- مارکل – ریپون، چاپ اول، ویرایش اول، بخش دوم، ص ۲۹۲ .

۲. اردهالی، ص.؛ رضایی، ح.ر. و ندیم، ا.ح.، ۱۳۷۳. انگل لیشمانیا و لیشمانیوز، مرکز نشر دانشگاهی تهران تحریر دوم. ص۴-۵.

۳. فرج‌نیا، ص.؛ علیمحمدیان، م.ح.؛ مهبودی، ف. و اژدری، س.، ۱۳۸۳. کلونینگ، بیان و ارزیابی ایمونولوژیک پروتئین p_4لیشمانیا ماژور، پایان نامه برای دریافت درجه دکتری، رشته فرآورده‌های بیولوژِک، انستیتو پاستور ایران، شماره ۲۵۴، ص۴-۷.

Archive of SID

www.SID.ir

۴. ممیشی، ن. و گیوی، م.، ۱۳۸۴. داروهای ژنریک ایران، ویرایش نینا ممیشی، انتشارات بشری، چاپ سوم، ص۶۹-۷.

۵. ناطقی رستمی، م. و دورقی، م.، ۱۳۸۴. ترجمه انگل‌شناسی پزشکی. چاپ اول. تهران: اتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران ص۸۹-۳۵.

۶. مهاجری، م.؛ شمسیان، س.ع.ا.؛ نهروانیان، ح.؛ محمودی، م.؛ یزدان‌پناه، م.ج. و شاهی، م.، ۱۳۸۷. ارزیابی سایتوکاین های مترشحه از سلول‌های Th2 , Th1و در مبتلایان به لیشمانیوز پوستی حساس و مقاوم به درمان با گلوکانتین، دوره ۵۱، شماره ۳، صفحه ۱۴۹-۱۵۴.

۷. هاشمی، س.؛ وزیری، ب. و رفیعی طباطبایی، ر.، ۱۳۸۴. تهیه نقشه پروتئینی تکرارپذیر فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور توسط الکتروفورز سه بعدی، پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد، رشته میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، شماره۲۶۴ ، ص ۱۴

8. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. and Pober, J.S., 1996. Cellular and Molecular immunology.*3rd ed*. 12: 15-21.
9. Ablij, H.C. and Meiners, A.E., 2002. C-reactive protein, history and revival. *Eur J Int Med*. 13: 412 - 422.
10. Amini, M.; Nahrevanian, H.; Khatami, S.H.; Farahmand, M.; Mirkhani, F. and Javadian, S., 2009. Association between essential trace elements and susceptibility to *Leishmania major* in Blab/c and C57Bl/b mice. *Int J Infect Dis*.13(1): 4-6.
11. Bertholet, S.; Debrabant, A.; Afrin, F.; Caler, E.; Mendez, S.; Tabbara, Kh.; Belkaid, Y. and Sacks, D., 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin–derived dendrite cells: implications for the initiation of anti-leishmania immunity. *J Exp Med.* 188(8): 1547-1552.
12. Blum, J.; Desjeux, P.; Schwartz, E.; Beck, B. and Hatz, C., 2004. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. *J Antimicrob Chem*. 53: 158-166.
13. Chen, Y.Q.; Zhou, Y.Q. and Wang, M.H., 2002. Activation of the ran receptor tyrosine kinas protects murine macrophages form apoptotic death induced by bacterial lipopolysacharide. *J Leukoc Biol*. 71: 359-366.
14. Chipuk, J.E.; Maurer, U.; Green, D.R. and Schuler, M., 2003. Pharmacologic activation of P53 elicits bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell*. 4: 371-381.
15. Colasanti, M.; Gradoni, L.; Mattu, M.; Persichini, T.; Salvati, L.; Venturini, G. and Ascenzi, P., 2002. Molecular bases for the anti- parasitic effect of NO (Review). *Int J Mol Med*. 9: 131-134.
16. Cullotta, E. and Keshland, D.E., 1992. New is good news. *Science*. 25: 1862-1865.
17. Henry, J.B., 1997. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. *Clin Chem*. 43: 197-198.
18. Nahrevanian, H.; Farahmand, M.; Aghighi, Z.; Assmar, M. and Amirkhani, A., 2007. Pharmacological evaluation of anti-leishmanial activity by in vivo nitric oxide modulation in Balb/c mice infected with Leishmania major MRHO/IR/75/ER; an Iranian strain of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 116(3): 233-240.
19. Pepys, M.B., 1982. CRP and the acute phase response. *Immunol Today*. 3(2): 27-32.
20. Sainte-Laudy, J., 2001. Acetylsalicylic acid: hypersensitivity, intolerance, or allergy? *Allerg Immunol*. 33(3):120-126.
21. Simon, L.; Croft, N.; Karin, S. and Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 123: 399- 410.
22. Thiessen, J.J., 1983. Aspirin: plasma concentration and effects. *Thromb Res Suppl.* 4: 105-111.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Todd, M. and Reeves, G., 2000. Lecture notes on immunology; 4th ed. *Oxford: Blackwell Science*, 267 -272.
24. Vainio, H. and Morgan, G., 1997. Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug. *Pharmacol Toxicol.* 81(4): 151-152.
25. Woads, M.S.; Maxer, J.; Evans, T.G. and Hibbs, J.B., 1994. Antiparasitic effects of nitric oxide in an in vitro model of Chlamydia trachoma tic infection and in vivo murine model of *Leishmania major* infection. *Immunol Ser*. 60: 172-195.
26. Nahrevanian, H. and Amini, M., 2009. Nitric oxide Function: an emphasis on its diversity in infectious diseases. *Irn J Med Sci*. 11(4):197-204.
27. Rafati, S.; Abraham, B.A.B.A.A.; Bakhshayesh, M. and Vafa, M., 2000. Vaccination of Balb/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine protease. *Clin Exp Immunol*. 120: 134-138.
28. Philippe, D., 2004. Disease watch, focus: leishmaniasis. *Nat Rev Mic*. 2: 692 -693.

Archive of SID

www.SID.ir