

اثر درمانی فیلمهای پارامومایسین سولفات به همراه جنتامایسین سولفات در درمان ضایعات جلدی موشهای Balb/c آلوده به *Leishmania major*

* سپیده طلوعی، * دکتر سید حسین حجازی، * مهیار مستقیم، ** دکتر گیتی صادقیان، ** دکتر علی اصلیان،

*** دکتر محمد علی شاطلی

* گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** مرکز صدیقه طاهره اصفهان، مرکز تحقیقات بیماریهای پوست و سالک

*** دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

خلاصه

لیشمانیوز بیماری عفونی است که در حال حاضر متجاوز از ۱۲ میلیون نفر در جهان به آن آلوده می‌باشند. از جمله اشکال مختلف آن شکل جلدی است که به عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در بسیاری از بخشهای جهان به خصوص در خاورمیانه مطرح است. با وجود روش های درمانی متنوع هنوز درمان رضایت بخشی در مورد شکل جلدی بیماری گزارش نشده است. در این مطالعه اثر درمانی فیلم های پارامومایسین سولفات به همراه جنتامایسین در درمان ضایعات جلدی ناشی از *Leishmania major* بر روی موشهای Balb/c مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تجربیات موجود در درمان بیماری با داروی پارامومایسین در ایران و جهان در این مطالعه فرم فیزیکی جدیدی از دارو به صورت فیلم های دارویی حاوی ۱۵ درصد پارامومایسین سولفات (شرکت Antibioticus-Italia) و ۰/۵ درصد جنتامایسین سولفات (شرکت داروپخش) در پایه ای از اتیل سلولز (شرکت Merck) و HPMC (هیدروکسی پروپیل متیل سلولز) (شرکت Shinetsu-Japan) مورد بررسی قرار گرفت. سه گروه شاهد، پلاسیبو و آزمون از موشهای ماده Balb/c شامل ۱۰ سر موش در هر گروه، که از طریق تزریق 2×10^6 پروماستیگوت انگل *L. major* (MRHO/IR/75/ER) به قاعده دم آلوده شده بودند، جهت انجام مطالعه در نظر گرفته شد. گروه شاهد فقط انگل، گروه پلاسیبو، انگل و دیسک فاقد دارو و گروه آزمون، انگل و دیسک حاوی داروی موثره دریافت کردند. موشها هر ۴ روز یکبار به مدت ۲۸ روز و همچنین ۱۶ هفته پس از درمان مورد پیگیری قرار گرفتند. نتایج با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون Duncan مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یافته های حاصل بر روی موشهای Balb/c در مدت زمان ذکر شده حاکی از اثرات درمانی معنی داری در گروه آزمون نسبت به دو گروه دیگر بوده است ($P < 0/001$) به طوری که پس از پایان دوره درمان ۸۰ درصد موارد در گروه آزمون بهبود یافتند ولی در دو گروه دیگر نشانه ای از التیام دیده نشد. با توجه به نتایج به دست آمده از اثرات فیلم دارویی در مدل حیوانی، پیشنهاد می گردد از این شکل فیزیکی داروی پارامومایسین به عنوان راه مناسبی برای درمان لیشمانیوز جلدی در بیماران استفاده شود. کلمات کلیدی: اثر درمانی، پارامومایسین سولفات، جنتامایسین سولفات، لیشمانیا، Balb/c.

مقدمه

مناطق از ایران و عواقب حاصل از آن از جمله طولانی بودن دوره بیماری، وجود جوشگاه ناشی از آن، همچنین مشکلاتی که در مبارزه با بیماری وجود دارد مانند تنوع گونه های پشه خاکی ناقل، نقش انسان و تعدادی از جانداران پستاندار به عنوان مخزن بیماری و مشکلات ناشی از کنترل بیماری، تحقیق در مورد تشخیص، درمان و پیشگیری این بیماری از اهمیت فوق العاده برخوردار است (۱). هدف از درمان بیماری، بهبود

انگل تک سلولی جنس *Leishmania* در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری طیف وسیعی از بیماری را در انسان ایجاد می کند و به عنوان یک مشکل بزرگ بهداشتی در نظر گرفته می شود (۱۲). این بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیماریهای قابل سرایت توسط بندپایان بوده و سازمان بهداشت جهانی آن را در زمره هشت بیماری مهم انگلی دنیا قرار داده است (۱۰). با توجه به آندمیک بودن لیشمانیوز (انواع جلدی و احشایی) در

هر میلی لیتر 2×10^7 انگل زنده موجود باشد. محلول آماده شده توسط سرنگ انسولین به قاعده دم موشها به میزان ۰/۱ میلی لیتر تزریق شد. پس از گذشت حدود یک ماه، زخمی در ناحیه تزریق پدید آمد. برای اطمینان از حضور انگل *Leishmania* در زخم از روش نمونه برداری و رنگ آمیزی با گیمسا و مشاهده با لام مستقیم در زیر میکروسکوپ و کشت ضایعه در محیط N.N.N. قبل و بعد از دوره درمانی و عود بیماری استفاده شد.

مرحله بعدی مطالعه درمان موشها با استفاده از فیلمهای دارویی که هر فیلم حاوی ۱۵ میلی گرم پاراموایسین سولفات و ۰/۵ میلی گرم جنتامایسین سولفات بود و چگونگی آزاد شدن دارو از فیلمها و مدت زمان مربوطه در مطالعاتی که تحت شرایط برون تنی انجام گرفت، مشخص گردید (اطلاعات در حال چاپ). در این مطالعه سه گروه ۱۰ تایی موش مورد بررسی قرار گرفتند. گروه اول، گروهی که تنها انگل دریافت کرده بود و کار درمانی روی آنها انجام نشد (گروه شاهد). گروه دوم، گروهی که علاوه بر انگل دیسک پلاسیو دریافت کرد و گروه سوم، گروهی که انگل و همچنین دیسک دارویی دریافت کرد. زخم موشها هر بار قبل از تعویض فیلمها با کولیس اندازه گیری و میانگین آنها یادداشت شد. نحوه تعیین اندازه زخم ها با اندازه گیری دو قطر عمود بر هم زخم بوسیله کولیس و گزارش میانگین آن تعیین می شد. دوره درمان ۲۸ روز در نظر گرفته شده بود و دیسک ها هر ۴ روز یک بار تعویض می شد. در کل هر موش ۷ دیسک دارویی در طول دوره درمان دریافت کرد و پس از آن موشها به مدت ۴ ماه مورد پیگیری قرار گرفتند. نتایج به دست آمده با تست های آماری آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

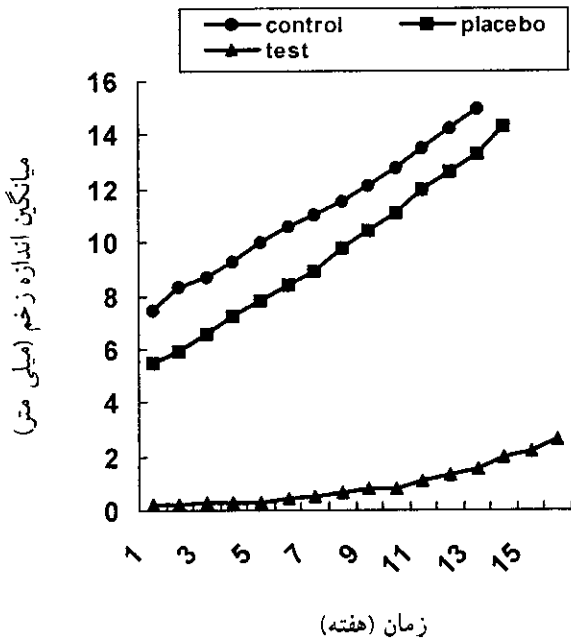
در دو گروه شاهد و پلاسیو میانگین اندازه زخم به طور مرتب افزایش داشت و این در حالی بود که میانگین اندازه زخم در گروه درمانی کاهش چشم گیری نشان می داد. در پایان دوره ۲۸ روزه درمان میانگین اندازه زخم در گروه درمان ۰/۱۹ میلی متر ($SD=0/04$) و در گروه پلاسیو ۰/۰۴ میلی متر ($SD=0/20$) و گروه شاهد ۶/۴۲ میلی متر ($SD=0/44$) بود به

سرعت زخم، عدم ایجاد جوشگاه و جلوگیری از عفونت ثانویه است. پس از گذشت سالها از شناخت بیماری مشکل درمان سالک از جمله مسائل طب امروز محسوب می شود و با توجه به کوشش های به عمل آمده هنوز درمان قطعی برای بیماری پیدا نشده است (۲). پاراموایسین سولفات آنتی بیوتیکی است که به طور مداوم برای درمان لیشمانیازیس جلدی و احشایی استفاده شده است (۴). نتایج و جمع بندیهای حاصل از بررسی اثر پاراموایسین بر ضایعات سالک در ایران مؤید این نکته است که تماس مداوم دارو با ضایعه می تواند اثرات مطلوب درمانی را دارا باشد (۳). تحقیقاتی نیز در زمینه بررسی اثر موضعی داروی پاراموایسین در درمان بیماری سالک در موشهای آزمایشگاهی صورت گرفته است که حاکی از موثر بودن این دارو بوده است (۵، ۷، ۸).

بر این اساس در این مطالعه اثر درمانی فیلمهای دارویی پاراموایسین سولفات به همراه جنتامایسین سولفات در درمان ضایعات جلدی ناشی از انگل *Leishmania* بر روی موشهای *Balb/c* مورد بررسی قرار گرفت. از خصوصیات این روش درمانی اینکه فیلمها به صورت مداوم با زخم تماس داشته و ماده موثره آن به تدریج آزاد می شود. جنتامایسین نیز آنتی بیوتیک وسیع الطیفی است که جهت کنترل عفونت های باکتریایی در این ترکیب استفاده شده است.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تجربی (experimental) بوده و متغیرهای آن شامل: التیام و طول مدت التیام می باشد. سه گروه مورد مطالعه، هر گروه شامل ۱۰ سر موش *Balb/c* ماده و هم سن (۶ تا ۸ هفته) که از انستیتو پاستور ایران دریافت شده بود، انتخاب شد. برای دستیابی به اهداف مورد نظر عملیات زیر انجام شد. در این بررسی *L.major* (MRHO/IR/75/ER) که در ایران به منظور تولید واکسن استفاده می گردد، جهت آلوده سازی گروههای موشی استفاده شد. برای این منظور ابتدا انگل در محیط N.N.N. و سپس در محیط RPMI 1640 همراه با ۲۰ درصد سرم جنین گوساله به عنوان مکمل، کشت داده شد و از فاز ایستای کشت جهت آلوده سازی استفاده گردید. به این ترتیب که ابتدا تعداد انگل توسط لام نوبار شمارش شد و حجم محلول انگلی به گونه ای تنظیم شد که در



نمودار ۲: میانگین اندازه زخم در سه گروه مورد مطالعه در طول مدت چهار ماه پیگیری.

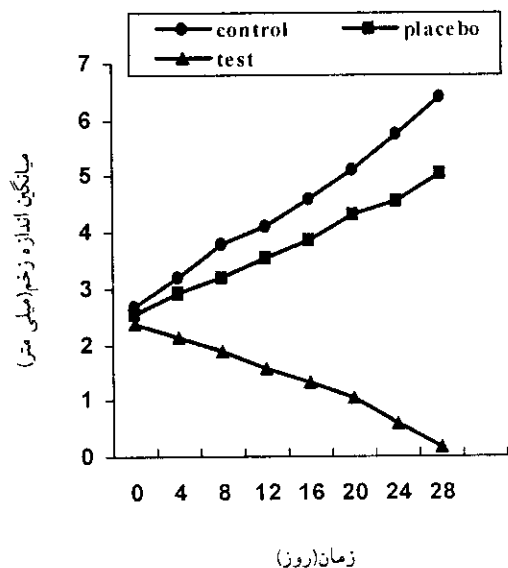
نتیجه گیری و بحث

انگل *Leishmania* دارای گونه های متعدد بیماری زا و غیر بیماری زا می باشد. تاکنون بیش از ۲۰ گونه بیماری زا برای انسان گزارش شده است (۱۱). هم اکنون درمان انتخابی انواع لیشمانیوز استفاده از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان می باشد. این ترکیبات سالها در درمان لیشمانیوز به کار رفته اند ولی با توجه به موارد مقاوم بیماری نسبت به درمان انتخابی و از طرفی به علت وجود عوارض متعدد این نوع ترکیبات، تلاش برای دستیابی به داروی جدیدی که بتواند ضمن اینکه زخم را سریعتر بهبود بخشد، کمترین عوارض جانبی را داشته باشد و پس از بهبود جوشگاهی بر جای نگذارد، ادامه دارد (۹). پاراموایسین از جمله آنتی بیوتیک هایی است که به تنهایی یا توامان در درمان لیشمانیوز جلدی و احشایی استفاده می شود. جنتامایسین نیز آنتی بیوتیک وسیع الطیفی است که در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، هر دو موثر بوده و در ضمن مشخص گردیده است که استفاده از آن همراه با پاراموایسین می تواند اثرات سینرژیک داشته باشد (۸). از مزایایی که فیلم دارویی نسبت به سایر اشکال دارویی مانند پماد دارد، تماس مداوم دارو با ضایعه می باشد. در صورتی که پماد و سایر داروهای موضعی به صورت موقت با ضایعه در تماس هستند و معمولاً با

طوری که بین این دو گروه آخر و گروه درمان اختلاف معنی داری ($P < 0.0001$) مشاهده گردید.

در پایان دوره درمان ۲۸ روزه ۸۰ درصد موشها در گروه آزمون کاملاً بهبود یافتند و ۲۰ درصد آنها زخمی با اندازه کوچکتر و در حدود ۱ میلی متر را نشان می دادند.

پس از پایان دوره درمانی هر سه گروه برای مدت ۴ ماه (۱۶ هفته) مورد پیگیری قرار گرفتند. میانگین اندازه زخم در گروه شاهد و پلاسبو در طول این مدت افزایش داشت. همچنین به دنبال احشایی شدن موشها در این دو گروه مرگ و میر در آنها مشاهده شد. به صورتی که در هفته ۱۳ در گروه شاهد و در هفته ۱۴ در گروه پلاسبو تمامی موشها از بین رفته بودند. در گروه درمان میانگین اندازه زخمها تا حدودی ثابت بود و پس از آن با عود بیماری در تعدادی از موشها در طول هفته نهم تا یازدهم پیگیری، ۳۰ درصد عود در این گروه مشاهده شد. در پایان دوره پیگیری ۵۰ درصد موشها بهبود یافتند و ۳۰ درصد موشها عود بیماری را نشان دادند که همراه با ۲۰ درصد موشهای بهبود نیافته، ۵۰ درصد موشها در گروه درمان در پایان مطالعه دارای زخم بودند (نمودار ۱ و ۲).



نمودار ۱: میانگین اندازه زخم در سه گروه مورد مطالعه در طول دوره درمان (۲۸ روز).

لیشمانیوز جلدی از بیماری‌های بومی کشور ماست، بنابراین یک روش درمانی موثر برای بیماری قسمتی از مشکلات بهداشتی و اقتصادی مملکت را برطرف خواهد کرد. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و با توجه به اختصاصات فیلمهای دارویی می‌توان ادعا نمود که این شکل دارویی از سایر اشکال مصرف شده قبلی تأثیر درمانی بیشتری بر زخم‌های سالک دارد. با تکرار آزمایش‌های مشابه با فیلمهای دارویی در دوره‌های درمانی و دوره‌های متفاوت می‌توان موثرترین دوز و کوتاهترین دوره را انتخاب کرد. همچنین با مشخص شدن نتایج پژوهش در مدل انسانی که همزمان با این مطالعه در حال انجام بوده است و نیز استاندارد کردن پایه فیلمها در آینده این دارو می‌تواند به صورت انبوه تولید شود و در اختیار کلیه مراکز درمانی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاری خانم دکتر گیلدا اسلامی و مرکز تحقیقات پوست و سالک دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند.

منابع

1. حجازی، سید حسین، بررسی ایمونولوژیک اجزاء آنتی ژنی *Leishmania major* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای تخصصی رشته انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۵.
2. صائی، ا، بیماری‌های انگلی در ایران، جلد اول بیماری‌های تک یاخته‌ای، سازمان انتشارات و آموزش انقلاب اسلامی، ۱۳۷۱، صفحات ۱۱۸-۱۱۶.
3. Asilian A., Jalayer T., 1995, A randomized placebo-controlled trial of a two week regimen aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran, Am. J. Trop. Med. Hyg., 53(6):648-651.
4. El-On J., Haelery S., Grund Wald M. H., Weinrauch L., 1992, Topical treatment of old world cutaneous leishmaniasis caused by *L. major*: A double-blind control study, J. Am. Acad. Dermatol., 27: 227-231.
5. EL-On J., Lang E., Kuperman O., 1989, *Leishmania major*: Histopathological responses before and after topical treatment in experimented animals, Exp. Parasitol., 68(2): 144-154.

فعالیت روزانه بیمار و یا شستشو ظرف مدت کوتاهی زایل می‌شود. همچنین آزاد شدن تدریجی دارو باعث می‌شود انگل در هر لحظه تحت تأثیر دارو به عنوان یک مهارکننده کشته قرار داشته باشد و نیز وجود جنتامایسین سولفات در فیلم دارویی از آلودگی ثانویه ضایعات که منجر به وخیم شدن و طولانی شدن دوره درمان آنها می‌شود، جلوگیری می‌کند. نتایج این مطالعه در مقایسه با مطالعه Gorgl M. و همکاران که از فرمولاسیون موضعی جدیدی از دارو یعنی WR 279 396 (۱۵ درصد پارامومایسین به اضافه ۵ درصد جنتامایسین) در درمان ضایعات سالکی موشهای Balb/c استفاده نموده‌اند، همخوانی دارد (۸). همچنین در مطالعه دیگری تأثیر پارامومایسین تنها بر انگل *Leishmania* در موشهای Balb/c مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه ۸۰ درصد زخمها آلودگی باکتریال داشتند (۶). در تحقیق حاضر به علت وجود جنتامایسین در ترکیب دارویی عفونت باکتریایی در ضایعات مشاهده نگردید. در مطالعه دیگری که توسط EL-On و همکاران صورت گرفت پاسخ سلولی در زخمهای *Leishmania* جلدی موشهای Balb/c که به طور موضعی با یک پماد حاوی ۱۵ درصد پارامومایسین سولفات و ۱۲ درصد متیل بنزوتونیم کلراید (MBCL) تحت درمان قرار گرفته بودند، مورد بررسی قرار گرفت (۵). گروه موشهای کنترل آلوده شده که تحت درمان قرار نگرفته بودند، زخمهای پیشرونده به همراه افزایش در تعداد انگل، ماکروفاژ، لنفوسیت ها و پلی مورفونوکلرها در مدت ۱۸ هفته نشان دادند. در گروه موشهایی که تحت درمان با پماد پارامومایسین قرار گرفته بودند التیام کامل زخمها در مدت ۴ هفته بعد از پایان مطالعه مشاهده شد، اما حذف کامل انگل در زخمها ۲ هفته دیرتر مشاهده گردید (۵).

در مطالعه حاضر نیز در پایان دوره درمان (۲۸ روز) در ۸۰ درصد موشهای گروه درمان انگل در زخم مشاهده نشد. لازم به ذکر است که چون مدل مورد بررسی در این مطالعه موشهای فوق العاده حساس Balb/c بوده است حذف انگل به دلیل احتشایی شدن در آنها ممکن نیست و علیرغم بهبود ضایعات جلدی مجدداً پس از قطع درمان عود انگل در آنها مشاهده می‌گردد.

9. Koerber W. A., 1978, Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony sodium gluconate, Arch. Dermatol., (114):1226.
10. Modabber F. , 1996 , Tropical Disease Research, 12th Program Report , UNDP/ World Bank/ W.H.O. , Special Program for Research and Training in Tropical Disease , (TDR) Geneva , W.H.O:134-146 .
11. W.H.O Expert Committee, 1990, Control of the leishmaniasis, World Health Organ. Tech. Rep. Ser., 793:1-158.
12. W.H.O/ G.T.D./L.C.O./, 1993, The Leishmaniasis control of tropical disease, (2):14.
6. EL-On J., Sneier R., Ehans E., 1992, Leishmania major: Bacterial contamination of cutaneous lesion in experimental animals, J. Med. Sci. , 28(12): 847-51.
7. EL- Safi S. H., Murphy A. G., Bryceson A. D., 1990, A double-blind clinical trial of the treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment , Tras. R. Soc. Trop. Med. Hyg. , 84 (5): 690-91.
8. Gorgl M., Schuster B.G., 1999 , Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with combination of paromomycin and gentamicine , J. Parasitol. ,85 (2): 354-9 .