

بررسی اثر کرم آزادکننده نیتریک اکساید بر ضایعه‌های جلدی لیشمانیوز در مدل حیوانی

ماندانا بخشی زاده^۱، دکتر سید حسین حجازی^۲، دکتر مهدی بقایی^۱، دکتر فریبا جعفری^۳، زهرا غیور^۱، دکتر علی خامسی پور^۴

۱- کارشناس ارشد، ۲- استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۳- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی؛ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۴- استادیار ایمونولوژی و میکروبیولوژی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جدام؛ دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه: سالک یکی از بیماری‌های بومی و شایع مناطقی از ایران است. درمان این بیماری با استفاده از روش‌های شیمیایی، فیزیکی یا به طور توأم صورت می‌گیرد. نیتریک اکساید دارای آثار ایمونولوژیک درون سلولی است و تولید آن در بهبود زخم لیشمانیایی در حیوان و انسان نقش به‌سزایی دارد. در این تحقیق اثر درمانی ترکیب‌هایی که در پایه کرم قادر به آزاد کردن نیتریک اکساید هستند بر ضایعه‌های جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش اجرا: موش‌های خالص نژاد Balb/c با تزریق زیرجلدی انگل لیشمانیا، در قاعده دم عفونی و پس از ظهور زخم به سه گروه - شاهد بدون درمان، دارونما و تجربی - تقسیم شدند. موش‌های گروه دارونما و تجربی روزی یک بار به مدت ۳۰ روز با کرم مربوط به صورت موضعی تحت درمان قرار گرفتند. اندازه زخم‌ها در روزهای ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ اندازه‌گیری شد. یافته‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن با قبول مرز معنی داری $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در روزهای ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میانگین اندازه زخم در گروه دریافت‌کننده کرم حاوی نیتریک اکساید نسبت به دو گروه دیگر کمتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: داروهای آزادکننده موضعی نیتریک اکساید می‌توانند در درمان لیشمانیوز مؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز، درمان، نیتریک اکساید

فصلنامه بیماری‌های پوست ۱۳۸۴؛ دوره ۸ (۴): ۲۶۰-۲۶۵

اعلام قبلی: ۱۳۸۹/۵

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۲۰

مقدمه
میزبان‌های مهره‌دار و بی‌مهره را در بیشتر نقاط دنیا آلوده می‌کنند (۱). بیماری در انسان به سه شکل اصلی دیده می‌شود: لیشمانیوز پوستی (سالک)، لیشمانیوز پوستی مخاطی (اسپوندیا) و لیشمانیوز احشایی (کالا آزار) (۲).

لیشمانیوز، بیماری ناشی از نوعی تک‌یاخته انگلی متعلق به جنس لیشمانیا است که گروه بزرگی از ارگانسیم‌ها را تشکیل می‌دهند و در چرخه تکاملی خود

مؤلف مسوول: دکتر سید حسین حجازی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

پست الکترونیک: hejazi@med.mui.ac.ir

برای یافتن داروهای جدید ادامه دارد (۱۰). با توجه به اثرات ایمنولوژیک درون سلولی نیتریک اکساید، در این پژوهش از ترکیهایی که در پایه کرم قادر به آزاد کردن نیتریک اکساید است، در درمان ضایعات جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور از مدل موش Balb/c استفاده شده است.

روش اجرا

در این مطالعه تجربی از موش‌های Balb/c، انگل لیشمانیای MRHO/IR/75/ER و محیط کشت RPMI 1640 (همراه بی‌کربنات و آل - گلوتامین و مکمل سرم جنین گوساله) استفاده شد. موش‌ها با تزریق زیرجلدی ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول انگلی حاوی سه میلیون پروماستیگوت فاز ایستا در ناحیه قاعده دم آلوده و پس از گذشت سه هفته و مشاهده ضایعات جلدی به سه گروه هشت تایی زیر تقسیم شدند.

گروه اول: گروه شاهد بدون درمان

گروه دوم: گروه تحت درمان با پایه کرم (گروه

دارونما)

گروه سوم: گروه تحت درمان با کرم ترکیبی نیتريت

پتاسیم با اسید استیک (نیتريت پتاسیم ۲ درصد و اسید استیک ۲ درصد که موقع مصرف به نسبت مساوی مخلوط و در سطح ضایعه مالیده می‌شد).

مداخله در دو گروه اخير روزی یک بار و به مدت سی

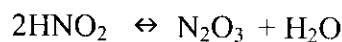
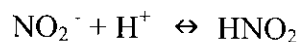
روز ادامه یافت. وسعت زخم‌ها در روزهای صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، و ۳۰ با کولیس اندازه‌گیری شد و میانگین قطر بزرگ و کوچک زخم‌ها به عنوان اندازه زخم در نظر گرفته شد.

یافته‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و دانکن (Duncan) با قبول مرز معنی‌داری

$P < 0.05$ تحلیل شد.

نیتریک اکساید (Nitric Oxide [NO]) که به شکل رادیکال از منابع داخلی تولید می‌شود، در دفاع میزبان علیه طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌ها، شامل باکتری‌ها، کاندیدا، لیشمانیا و قارچ‌ها (۳-۵) نقش مؤثر و مهمی را ایفا می‌کند. غلظت نیتریک اکسایدی که وسیله آنزیم القاکننده‌ی سنتز NO (iNOS) در چنین تیپ سلولی از قبیل ماکروفاژها پس از تحریک با لیپوپلی ساکارید باکتریایی و سایتوکین‌های اینترلوکین - ۱۶، اینترفرون گاما و فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF- α) تولید می‌شود زیاد است (۶،۷).

نیتریک اکساید به وسیله باکتری‌ها و احیای شیمیایی نترات در معده و دهان و سطح پوست (۸) آزاد می‌شود و نقش مهمی در کاهش عفونت‌ها دارد. با اسیدی کردن نیتريت (NO₂)، نیتریک اکساید از دی نیتروژن تری اکسید واسط (N₂O₃) آزاد می‌شود.



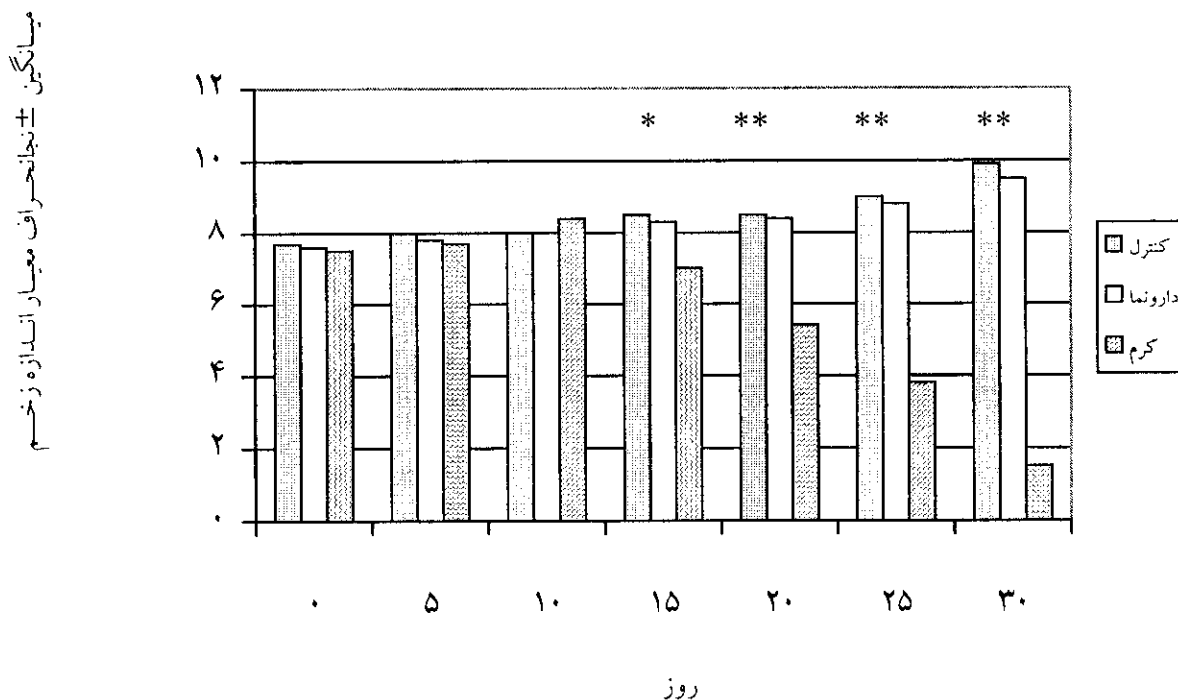
نیتریک اکسایدی که به این شکل آزاد می‌شود به سرعت در بافت انتشار می‌یابد و بدون ایجاد آسیب بافتی در میزبان، قادر به کشتن انگل درون سلولی لیشمانیا است. این انگل عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها در انسان، تحت عنوان کلی لیشمانیازیس است (۸،۹).

نیتریک اکساید، نیمه عمر کوتاهی دارد و اندازه‌گیری آن مشکل است و از اندازه‌گیری نترات اغلب به عنوان جانشینی برای تولید نیتریک اکساید استفاده می‌شود (۹). در حال حاضر درمان انتخابی برای لیشمانیوز پوستی ترکیب‌هایی از آنتی‌موان با عناوین گلوکانتیم (Glucantime) و پنتوستام (Pentostam) است که به علت داشتن عوارض جانبی از قبیل تهوع، درد شکم، سرفه، بشورات جلدی و تغییرات موج الکتروکاردیوگرام تلاش

یافته‌ها

میانگین اندازه زخم در زمان شروع مطالعه (سه هفته بعد از آلوده شدن موش‌ها) در گروه اول، دوم و سوم به ترتیب ۷/۴۸، ۷/۱۸ و ۷/۰۷ میلی‌متر بود ($P > 0.05$). در روزهای پنجم و دهم درمان بین اندازه زخم در گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

اختلاف اندازه زخم در گروه سه در روز ۱۵ و روزهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درمان، با دو گروه دیگر معنی‌دار بود ($P < 0.05$). میانگین اندازه زخم در پایان مطالعه (روز ۳۰) در گروه اول، دوم و سوم به ترتیب ۹/۸۵، ۹/۲۵ و ۱/۴۸ میلی‌متر بود (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین اندازه زخم سالک در روزهای ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ در گروه‌های دریافت کننده‌ی کرم اسید استیک حاوی نیتريت پتاسيم، دارونما و گروه کنترل.
 $P < 0.05$ ، * $P < 0.01$ ، ** در مقایسه با گروه کنترل

بحث

بهبود یافتند و شواهد بافت‌شناسی هم مؤید بهبود زخم بود، چرا که از لحاظ پارازیتولوژی لام مستقیم‌شان منفی شد و در این مدت عوارض جانبی نظیر ریزش مو، التهاب و قرمزی دیده نشد. مهم‌ترین درمانی که امروزه برای درمان لیشمانیوز به کار می‌رود، ترکیب‌های پنج‌طرفیتی آنتی‌موان است که با اسامی تجارتي گلوکانتیم و پنتوستام عرضه می‌شود ولی به دلیل عوارض جانبی، تلاش برای دستیابی به

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که درمان سی‌روزه با کرم ترکیبی نیتريت - اسید استیک (باغلظت ۲٪) توانایی کنترل پیش‌رفت زخم‌ها را دارا بوده و دارای اثر رضایت‌بخش درمانی است. به طوری که پس از پایان درمان سی‌روزه ۱۲/۵ درصد زخم‌ها التیام یافته بودند و بقیه زخم‌ها طی ۴ هفته بعد از درمان یعنی در عرض ۶۰ روز

این مدت درمانی به طور کامل التیام یافتند و ۱۲۰ روز بعد از درمان عودی از زخم دیده نشد. در گروهی که با پارامومایسین سولفات ۵ درصد درمان شدند، زخم‌ها ۷۰ روز بعد از درمان عود صد در صد داشتند (۱۴). در مقایسه با ترکیب‌های دارویی استفاده شده در این مطالعه، محققان مختلف از ترکیب‌های شیمیایی دیگری نیز استفاده کرده‌اند، به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط EL-on و همکاران وی که روی لیشمانیوز ناشی از L. major در موش‌های Balb/c صورت گرفت، پماد موضعی ۱۵ درصد پارامومایسین سولفات و ۱ تا ۲ درصد متیل بنزتونیوم کلراید (methylbenzethonium chloride) [MBCL] در پارافین نرم مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مقایسه‌ای روی چهار ترکیب دارویی به صورت جنتامایسین، پارامومایسین و پارامومایسین به همراه متیل بنزتونیوم کلراید و متیل بنزتونیوم کلراید تنها به عمل آمد. این موش‌ها که دوبار در روز و به مدت ده روز با ترکیب‌های دارویی فوق تحت درمان قرار گرفتند، بهبود یافتند ولی بعد از ۵۸ روز عود نشان دادند. در مقایسه این ۴ ترکیب درمانی، مؤثرترین آن‌ها استفاده از پارامومایسین به همراه MBCL بوده است (۱۵).

در مطالعه‌ای که اثر گلوکانتیم روی زخم‌های ناشی از L. major روی موش‌های Balb/c بررسی شد، غلظت‌های مختلف گلوکانتیم با مقادیر ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، در روز برای درمان به کار گرفته شد. طول دوره درمان در این مطالعه ۲۰ روز و مدت پیگیری آن ۱۲ هفته بود (۱۶). در گروه موش‌هایی که دریافت‌کننده‌ی گلوکانتیم به میزان ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم در روز بودند، این دز گلوکانتیم نتوانست سیر پیش‌رونده زخم را کنترل کند ولی در موش‌های دریافت‌کننده‌ی گلوکانتیم به میزان ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن در روز این دارو نتوانست از هفته چهارم به

داروهایی با سرعت عمل بیش‌تر و عوارض کم‌تر ادامه دارد (۱۲-۱۰). کرم ترکیبی نیتريت پتاسیم با اسید استیک آزادکننده‌ی خارجی نیتریک اکسید است و نیتریک اکساید مولکولی که می‌تواند به پوست نفوذ کند - زیرا از نظر اندازه کوچک است و از طریق حلال‌های آبی و غشاهای لیپیدی توانایی انتشار دارد - قادر به کشتن لیشمانیا است. از طرفی، نیتریک اکساید نفوذ کرده می‌تواند به صورت سیستماتیک عمل کند و از عود مجدد زخم که به علت احتشایی شدن بیماری به وجود می‌آید جلوگیری می‌نماید (۹، ۱۳). در مطالعه‌ای که توسط Davidson و همکاران وی در سال ۲۰۰۰ در مورد اثر درمانی کرم ترکیبی نیتريت پتاسیم با کلراید پتاسیم (غلظت ۰/۰۲) طی ده روز، روزی یک بار روی موش‌های Balb/c صورت گرفت، از درمان با پنتوستام با دز درمانی ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن به عنوان داروی مبنا استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب فوق نظیر داروی فوق مؤثر است و موجب بهبودی زخم می‌شود (۹). همین محقق مطالعه مشابهی با کرم ترکیبی اسید اسکوریک با نیتريت پتاسیم (غلظت ۰/۰۲) و کرم ترکیبی نیتريت پتاسیم و اسید سالیسیلیک (غلظت ۰/۰۲) در مدل حیوانی Balb/c انجام داد و در نهایت مشاهده کرد که این شیوه درمانی مفید نیست. دلیل آن را به لیسیدن و مالیده شدن کرم وسیله موش‌ها نسبت داد (۹). در حالی که در مطالعه حاضر تأثیر کنترلی این ترکیب بر بیماری مشهود بود و احتمالاً دوره درمانی محققین ذکر شده کوتاه بوده است.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، از درمان توأم کرم موضعی پارامومایسین سولفات ۵ درصد و اینترکولین-۱۲ نوترکیب (rIL-12) به طور توأم، برای درمان لیشمانیوز جلدی ناشی از L. major در موش‌های Balb/c دوبار در روز به مدت ۱۲ روز استفاده شد. زخم‌ها در گروهی که از درمان توأم استفاده کرده بودند، در عرض

بعد اندازه زخم را تا حدی ثابت نگه دارد و از توسعه آن جلوگیری کند. به هر حال اندازه زخم از ۵/۴۰ میلی‌متر در هفته اول در هفته آخر به ۶/۹۱ میلی‌متر رسید (۱۶). این در حالی است که در این مطالعه، میانگین اندازه زخم در گروه درمان از ۷/۷۰ میلی‌متر در آغاز مطالعه به ۱/۴۸ میلی‌متر در پایان دوره درمان رسید. در مطالعه‌ای که توسط Soto و همکاران وی در سال ۲۰۰۲ صورت گرفت، از WR279396 - که فرمولاسیون موضعی از آمینو گلیکوزیدهاست - در درمان لیشمانیوز پوستی در موش استفاده شد که صد در صد بهبودی به همراه داشت (۱۷). در سال ۱۹۹۲ Fournet و همکاران او در فرانسه، موش‌های آلوده به لیشمانیا مکزیکانا را با داروهای گلوکانتیم و نفتو کینون (nephtoquinone) تحت درمان قرار داده‌اند (۱۸). در این تحقیق، درمان ۲۴ ساعت پس از

تلقیح شروع شد ولی در مطالعه حاضر درمان حدود ۳۰ روز بعد از تلقیح انگل و همزمان با ظهور زخم آغاز شد. در مطالعه Fournet، داروها به صورت موضعی در محل زخم تزریق شد ولی در این تحقیق دارو به طور موضعی مصرف شد. در مطالعه مزبور، این نتیجه به دست آمد که داروی نفتو کینون نسبت به گلوکانتیم تأثیر کم‌تری دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر محمود حسینی و سرکار خانم دکتر گیلدا اسلامی و سرکار خانم خزایی که در طول مطالعه ما را صمیمانه یاری کردند، قدردانی می‌شود.

References

- 1-Williams JE. Leishmania and Trypanosoma. In: Gillespie SH, Hawkey PM (eds). Medical parasitology. A practical approach. London: Oxford University Press; 1995: 151-76.
- 2-Mauel J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to Leishmania spp. *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 1996; 38: 1-15.
- 3-Mancinielli RI, McKay CP. Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Appl Env Microbiol* 1983; 46: 198-202.
- 4-Suga M, Satao K, Maeda II, et al. Resistance to nitric oxide in Mycobacterium avium complex and its implication in pathogenesis. *Infect Immun* 1993; 61: 1980-89.
- 5-Jones Carson J, Vazques Torres A, Vander Heyde HC, et al. Gamma delta T cell induced nitric oxide production enhances resistance to mucosal candidiasis. *Nature Med* 1995; 1: 552-57.
- 6-Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995; 60: 323-71.
- 7-Weller R, Ormerod AD, Hobson RP, et al. A randomized trial of acidified nitrite cream in the treatment of tinea pedis. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: 559-63.
- 8-Weller R, Pattullo S, Smith L, et al. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 327-31.
- 9-Davidson RN, Yardley V, Croft SL, et al. A topical nitric oxide generating therapy for cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 319-322.
- 10-Hellier I, Dereure O, Tournillac F, et al. Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis by pentamidine isethionate: an open study of 11 patients. *Dermatol* 2000; 200: 120-23.

- 11-Arana B, Rizzo N, Diaz A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: a review. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190: 93-95.
- 12-Lieber Mbomey A, Lipsker D, Milea M, et al. Rhabdomyolysis induced by pentamidine (pentacarinat) during treatment of cutaneous leishmaniasis: 2 cases. *Ann Dermatol Venereol* 2002; 129: 50-52.
- 13-Zein B, Banfield C, Al Assad S. Topical glyceryl trinitrate: a possible treatment for cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 1997; 22: 244-45.
- 14-Fernandes AP, Carvalho FA, Tavares CA, et al. Combined interleukin-12 and topical chemotherapy for established leishmaniasis drastically reduces tissue parasitism and relapses in susceptible mice. *J Infect Dis* 2001; 183: 1646-52.
- 15-El-on J, Sulitzcanu A. Leishmania major resistance of promastigotes to paromomycin and susceptibility of amastigotes to paromomycin methylbenzethonium chloride ointment. *Ann Trop Med Parasitol* 1991; 85: 323-28.
- ۱۶- ایزدی ش. بررسی مقایسه ای داروهای سایمتیدین و گلوکانتیم بر لیشمانیوز پوستی *L.major* در مدل آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران: دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۵.
- 17-Soto J, Toledo JT, Gutierrez P, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 147-51.
- 18-Fournet A. Effect of natural naphthoquinones in Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *Leishmania venezulensis*. *Arop Med Parasitol* 1992; 43: 219-22.