

بررسی اثر درمانی پماد سنتی سالک (H.H.1125) بر ضایعات لیشمانیوز جلدی موش آزمایشگاهی

سپیده طلوعی^۱، منیژه نریمانی^۲، دکتر محسن طحانی^۳، دکتر سید حسین حجازی^{۴*}

تاریخ دریافت ۸۹/۱/۲۰، تاریخ پذیرش ۸۹/۳/۵

چکیده

پیش زمینه و هدف: لیشمانیوز بیماری عفونی است که در حال حاضر متجاوز از ۱۲ میلیون نفر در جهان به آن آلوده هستند. شکل جلدی آن به عنوان یک مشکل مهم بهداشتی می باشد. تا کنون درمان رضایت بخشی در مورد شکل جلدی بیماری گزارش نشده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه اثر درمانی پماد سنتی سالک تحت کد H.H.1125 در درمان ضایعات جلدی ناشی از *Leishmania major* در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت. سه گروه صفر، شاهد و آزمون از موش‌های Balb/c و C57BL/6 شامل ۱۰ سر موش در هر گروه که از طریق تزریق $10^6 \times 2$ پروماستیگوت انگل *L. major* (MRHO/IR/75/ER) به قاعده دم آلوده شده بودند، جهت انجام مطالعه در نظر گرفته شد. موش‌ها به مدت ۳۰ روز و روزی ۲ بار با داروی H.H.1125 تحت درمان قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل بر روی موش‌های Balb/c نشان داد که در پایان دوره درمانی ۸۰ درصد موش‌ها در گروه آزمون کاملاً بهبود یافته بودند ولی در دو گروه دیگر نشانه ای از التیام دیده نشد ($P < 0.05$). موش‌های نژاد C57BL/6 تظاهر بیماری را به صورت ندول نشان دادند. در پایان دوره درمان در گروه آزمون ۱۰۰ درصد این موش‌ها بهبود یافتند.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده از اثرات پماد سنتی در مدل حیوانی به نظر می‌رسد این دارو می‌تواند ماده مؤثری در درمان ضایعات ناشی از لیشمانیوز پوستی به حساب آید.

کلید واژه‌ها: H.H.1125, Balb/c, C57BL/6, *L. major*, لیشمانیوز جلدی، درمان

آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی تلفن: ۰۲۷۲۴۲۷-۷۹۲۲۴۲۷-۳۱۱ همراه: ۰۹۱۳۳۱۱۸۷۱۱

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره سوم، ص ۲۵۴-۲۴۸، پاییز ۱۳۸۹

Email: hejazi@med.mui.ac.ir

مقدمه

الجزیره، برزیل، عراق و ایران وجود دارد (۴). با توجه به آندمیک بودن لیشمانیوز جلدی در مناطقی از ایران و عواقب حاصل از آن از جمله طولانی بودن دوره بیماری، وجود جوشگاه ناشی از آن و مزمن شدن بیماری در بعضی موارد، این بیماری در زمره بیماری‌های مهم کشور ما قرار گرفته است. همچنین به دلیل مشکلاتی که در کنترل این بیماری وجود دارد مانند تنوع پشه خاکی ناقل و تعدادی از جانداران پستاندار به‌عنوان مخازن بیماری از یک طرف و عدم دستیابی به یک واکسن مؤثر از طرف دیگر تحقیق در زمینه درمان و یافتن دارویی مؤثر همچنان از اهمیت زیادی برخوردار است (۵).

لیشمانیوز بیماری ناشی از نوعی تک یاخته انگلی متعلق به جنس *Leishmania* از خانواده Trypanosomatidae است (۱). حدود ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر دنیا در خطر ابتلا به این بیماری هستند (۲). و هر ساله ۲ میلیون مورد جدید از بیماری گزارش می‌شود (۲). معمولاً بسته به گونه انگل و پاسخ‌های ایمنی میزبان طیف بالینی متفاوتی از بیماری ایجاد می‌گردد (۳). لیشمانیوز جلدی در زمره این گرفتاری‌ها است که ۹۰ درصد موارد آن در کشورهایمانند افغانستان، عربستان سعودی،

^۱ کارشناس ارشد انگل شناسی و دانشجوی Ph.D، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان

^۲ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان

^۳ پزشک عمومی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان

^۴ دانشیار انگل شناسی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان (نویسنده مسئول)

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع experimental می‌باشد.

۱- حیوان آزمایشگاهی

در این مطالعه از موش‌های inbred ماده Balb/c حساس و C57BL/6 مقاوم به بیماری در سنین ۶ تا ۸ هفته که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد استفاده گردیده است. از هر نژاد سه گروه صفر، شاهد و آزمون شامل ۱۰ سر موش وارد مطالعه شدند. گروه‌های طراحی شده به شرح زیر می‌باشد:

۱- گروه صفر: گروهی که جهت بررسی شرایط حیوان خانه از آن استفاده شد.

۲- گروه شاهد: گروهی که تنها انگل دریافت کردند و کار درمانی روی آن‌ها صورت نگرفت.

۳- گروه آزمون: گروهی که پس از دریافت انگل کار درمانی روی آن‌ها انجام شد.

۲- کشت انگل

انگل L.major (MRHO/IR/75/ER) جهت آلوده سازی گروه‌های موشی استفاده شد. این لاین به صورت cryopreserved در آزمایشگاه گروه انگل و فارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در تانک ازت نگهداری می‌شود. برای این منظور ابتدا انگل در محیط NNN و سپس در محیط RPMI 1640 (GIBCO) همراه با ۲۰ درصد سرم جنین گوساله (GIBCO) به عنوان مکمل کشت داده شد و از فاز ایستای کشت جهت آلوده سازی موش‌ها استفاده گردید (۱۱). به این ترتیب ابتدا تعداد انگل شمارش شد و حجم محلول انگلی به گونه‌ای تنظیم شد که در هر میلی لیتر 2×10^6 انگل زنده موجود باشد.

۳- آلوده سازی حیوان آزمایشگاهی

محلول آماده شده توسط سرنگ انسولین به قاعده دم موش‌ها به میزان ۰/۱ میلی لیتر تزریق شد. پس از گذشت دو تا سه هفته ضایعات پوستی 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 NNN قبل و بعد از دوره درمانی بیماری استفاده شد.

۴- درمان حیوان آلوده شده

سه گروه ۱۰ تایی موش از هر نژاد شامل گروه آزمون، گروه دارونما و گروه صفر که فقط جهت بررسی مطلوب بودن شرایط حیوان خانه از آن استفاده شد و تنها انگل دریافت نموده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. وجود یا عدم وجود آماستیگوت انگل لیشمانیا پس از اتمام دوره درمان با آزمایش لام رنگ آمیزی شده گیمسا مورد بررسی قرار گرفت.

به‌رغم این‌که سال‌ها از شناسایی بیماری لیشمانیوز می‌گذرد، مشکل درمان سالک از جمله مسائل طب امروز محسوب می‌شود. با وجود بررسی‌های مختلف درمانی، هنوز روش قاطعی در این مورد گزارش نشده است (۳).

ترکیبات آنتی موان پنج ظرفیتی هنوز هم داروی انتخابی اول، در درمان این بیماری محسوب می‌شوند. از آنجایی که تزریق روزانه ترکیبات آنتی‌موان پر زحمت، گران و دارای اثرات سمی است، ارزیابی راه‌های درمانی دیگر از جمله درمان‌های موضعی مورد توجه قرار گرفته است (۶). از جمله درمان‌های موضعی پاراموماسین است که هنوز نتایج قابل قبولی از آن بدست نیامده است (۶).

در سال‌های اخیر مشخص شده است که ترکیبات برگرفته از طبیعت تا حد زیادی می‌تواند خاصیت ضد لیشمانیایی داشته باشد (۳،۷،۸). در مناطق آندمیک به دلیل عدم دستیابی به یک درمان قاطع جهت محدود کردن علایم بیماری، استفاده از داروهای سنتی رواج بیشتری دارد (۹). اکثر این داروهای سنتی با استفاده از گیاهان محلی آن منطقه خاص تهیه می‌شوند (۱۰). در ارتباط با داروهای سنتی تاکنون نتایج بدست آمده متغیر بوده است. داروهای گیاهی موضعی به لحاظ منشاء طبیعی آن‌ها در صورتی که دارای اثربخشی مناسبی نیز باشند، می‌توانند جانشین خوبی برای داروهای شیمیایی تزریقی گردند (۳).

در این تحقیق از پماد سنتی سالک با کد H.H.1125 استفاده شد. این دارو مخلوطی از مواد با منشأ گیاهان واجد آلکالوئید همراه با ۲۰ درصد تتراکلریک اسید (TCA) در پایه وازلین است.

به خاطر وفور بیماران در فصل شیوع و وجود تجربه استفاده از تتراکلریک اسید در اقداماتی که ماهیت Cosmetic داشته است (مثلاً Dermabresion) با استفاده از این متد ایمن بود آن را در عمل اثبات نموده است. در تجربیاتی که در مرکز تحقیقات پوست و سالک انجام شده است، استفاده از TCA بدون داروهای شیمیایی یا همراه با آن قادر بوده است که دوره بهبود ضایعات ناشی از لیشمانیا را کاهش دهد. از طرف دیگر مشخص گردیده است که گیاهان حاوی آلکالوئید نظیر اسپند و گل گاوزبان می‌تواند اپیتلیزاسیون جلدی را در ناحیه ضایعه تحریک نماید (۸). لذا فرمولاسیون این دارو با توجه به این تجربیات انجام گرفت و ترکیب مربوطه در پایه وازلین طراحی و جهت این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

در این بررسی اثر پماد H.H.1125 در درمان ضایعات CL موش آزمایشگاهی بررسی شد تا میزان اثر بخشی در مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد و در صورت مطلوب بودن نتایج مطالعه حاضر، پماد در زخم‌های انسانی نیز امتحان شود.

آزمون تی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

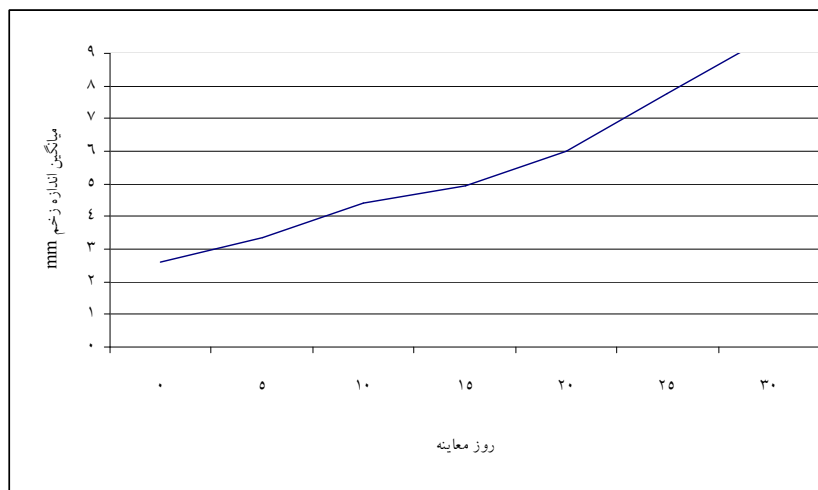
یافته‌ها

در گروه شاهد Balb/c میانگین اندازه زخم از ۳/۳ میلی‌متر در روز پنجم درمان به ۹/۵۳ میلی‌متر در روز ۳۰ درمان رسید. بدین ترتیب اندازه زخم سیر افزایشی داشت و هیچ بهبودی در آن‌ها مشاهده نشد. در گروه شاهد C57BL/6 به دلیل تفاوت سطح ایمنی موش‌ها به جای زخم ندول ایجاد شد. در این گروه میانگین اندازه زخم‌ها تا روز ۲۰ درمان تا حدودی سیر افزایشی داشت اما بعد از آن کاهش یافت و در دوره پیگیری خود به خود ناپدید شد (نمودار ۱ و ۲).

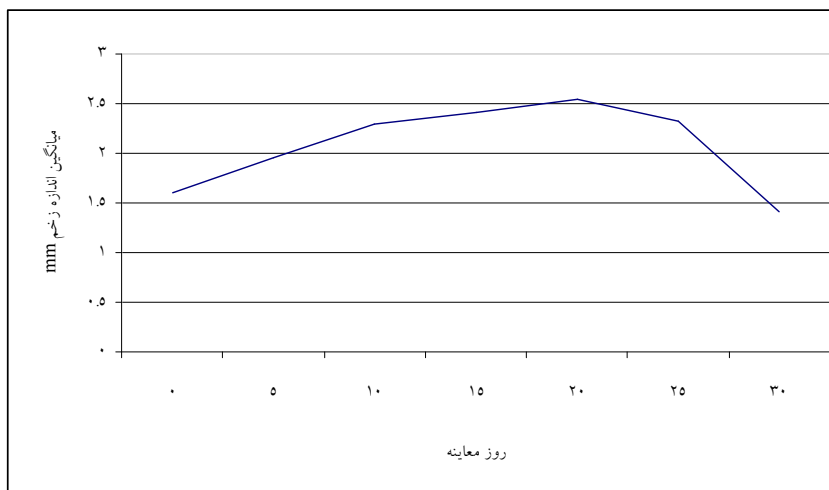
زمان شروع درمان به عنوان روز صفر محسوب گردید و موش‌ها به مدت ۳۰ روز و روزی ۲ بار (صبح و عصر) با استفاده از داروی مورد مطالعه تحت درمان قرار گرفتند. طی ۳۰ روز دوره درمانی، هر پنج روز یکبار زخم موش‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها یادداشت شد. نحوه تعیین اندازه زخم‌ها با اندازه‌گیری دو قطر عمود بر هم زخم به وسیله کولیس و گزارش میانگین آن تعیین می‌شد. پس از دوره درمانی موش‌ها به مدت هشت هفته از نظر میزان مرگ و میر و عود بیماری مورد پیگیری قرار گرفتند.

۵- آنالیز آماری

تمامی نتایج بدست آمده در مراحل مختلف مطالعه با



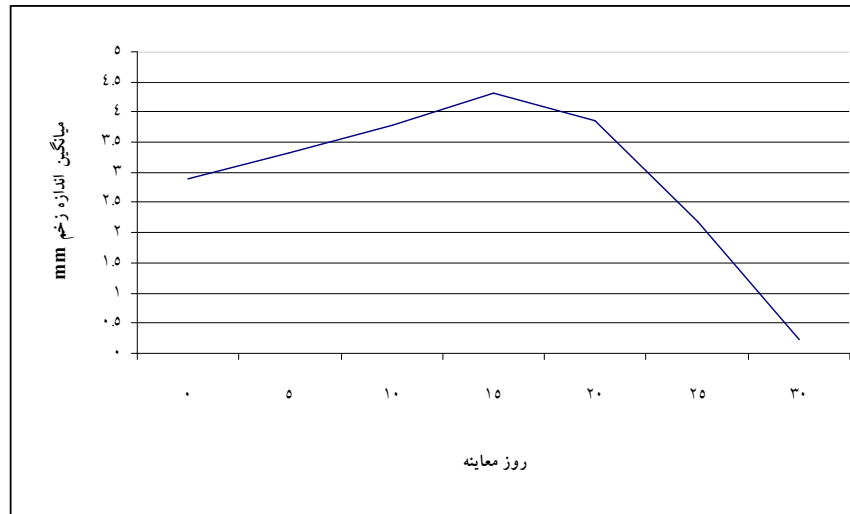
نمودار شماره (۱): میانگین اندازه زخم در موش‌های گروه شاهد Balb/c



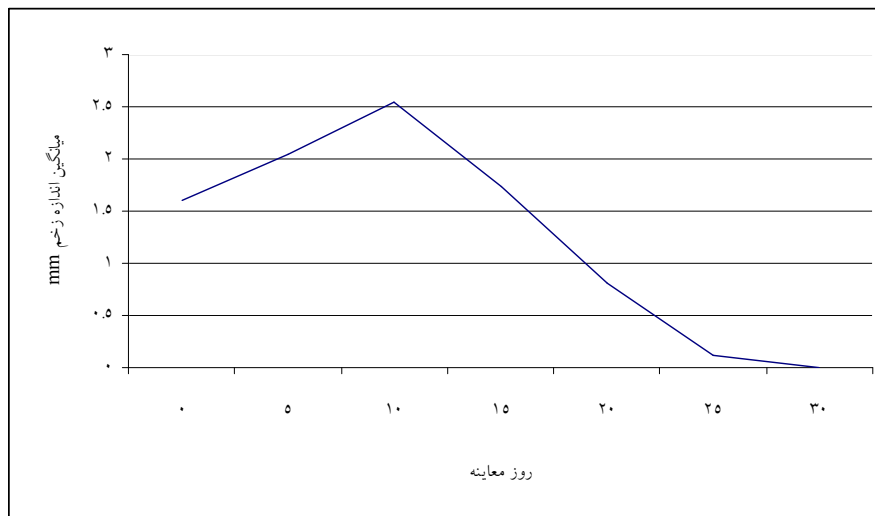
نمودار شماره (۲): میانگین اندازه زخم در موش‌های گروه شاهد C57BL/6

دوره درمانی کامل می‌باشد که با آزمایش مستقیم محل ضایعه و بررسی وجود یا عدم وجود انگل‌های لیثمانیا مشخص می‌شد. در گروه آزمون C57BL/6 از روز دهم درمان میانگین اندازه زخم‌ها سیر نزولی نشان داد و در پایان دوره درمانی ۱۰۰ درصد موش‌ها بهبود یافتند (نمودار ۳ و ۴).

در گروه آزمون Balb/c اندازه زخم‌ها تا روز پانزدهم سیر افزایشی داشت و از آن به بعد سیر التیام به دنبال درمان در آن‌ها مشهود شد. به طوری که در پایان دوره درمانی تنها در ۲۰ درصد موش‌ها ضایعه فعال وجود داشت و ۸۰ درصد آن‌ها بهبود یافتند (شکل ۱). منظور از بهبودی مشاهده بالینی التیام اولسر و اپیتلیزاسیون مجدد جلدی و عدم وجود انگل در ضایعه پس از



نمودار شماره (۳): میانگین اندازه زخم در موش‌های گروه آزمون Balb/c



نمودار شماره (۴): میانگین اندازه زخم در موش‌های گروه آزمون C57BL/6

موش‌ها مردند. در گروه شاهد C57BL/6 نیز طی مدت مطالعه مرگ و میری مشاهده نشد. از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شاهد و آزمون در هر دو نژاد از نظر مرگ و میر و عود ضایعات در دوره پیگیری مشاهده نشد.

با استفاده از آزمون تی تفاوت میانگین دو گروه شاهد و آزمون تجزیه و تحلیل شد. این تفاوت در موش‌های Balb/c از روز بیستم ($P < 0/01$) و در C57BL/6 از روز پانزدهم ($P < 0/01$) معنی‌دار بود. طی هشت هفته پیگیری هیچ مورد عود بیماری و مرگ و میر در گروه‌های آزمون مشاهده نشد ولی در گروه شاهد Balb/c ۲ سر از



C

B

A

شکل شماره (۱): A- زخم سالک در قاعده دم موش Balb/c قبل از شروع درمان، B- موش Balb/c در حین درمان، C- موش Balb/c بهبود یافته

(۱) بررسی میزان اثر بخشی دارو

داروهای موضعی متفاوتی برای درمان لیشمانیوز مورد مطالعه قرار گرفته اند. یکی از این داروها پماد حاوی ۱ درصد فلوکوتازول است که در استفاده موضعی بر روی زخم‌های ناشی از L.major در موش Balb/c تأثیر قابل قبولی در کاهش اندازه زخم و بهبودی بیماری نداشته است (۱۱).

از میان داروهای موضعی پاراموایسین بیش از سایر داروها در مدل‌های انسانی و حیوانی توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷). همچنین مشخص شده که استفاده از پاراموایسین به صورت موضعی زمانی می‌تواند مؤثرتر باشد که همراه با methyl benzethonium chloride (MBCL) به منظور نفوذ عمیق‌تر جلدی دارو استفاده شود (۱۸). در مطالعه‌ای که در آن از فرمولاسیون جدیدی از پاراموایسین استفاده شده بود و اثر بخشی این دارو در ضایعات جلدی ناشی از L.major در موش‌های Balb/c مورد بررسی قرار گرفته بود، پس از اتمام دوره درمان و در دوره پیگیری در ۳۰ درصد موارد عود بیماری گزارش شد. این در حالی است که در مطالعه حاضر گزارشی از عود بیماری وجود نداشت (۱۹).

در مطالعه دیگری که در آن میزان اثر بخشی Diminazen در Acetate با Ceterimonium Bromide و Chlorhexidine در شرق سودان مقایسه شده بود، با وجود این که میزان بهبودی در گروهی که Diminazen استفاده کرده بودند، سریع‌تر از گروه‌های دیگر بود اما نتایج در هر سه مورد در حد قابل قبول نبود (۲۰).

در مطالعه حاضر ۸۰ درصد گروه آزمون Balb/c در پایان دوره درمان کاملاً بهبود یافتند و در گروه C57BL/6 ندول‌های ایجاد شده تا روز ۲۵ دوره درمان ۹۰ درصد و تا روز ۳۰ دوره درمان کاملاً

بحث

لیشمانیوز جلدی سال‌ها است که مورد مطالعه پژوهش‌گران قرار گرفته است و راه‌های مختلفی برای مبارزه با آن به کار گرفته شده است. استفاده از آنتی‌موان‌های پنج ظرفیتی سدیم استیوگلوکونات (پنتوستام) و گلوکانتیم از سال ۱۹۴۰ آغاز شده است و از آنجایی که میزان اثر بخشی آن تا حدود ۹۰ درصد می‌باشد، همچنان به‌عنوان خط اول درمانی از آن استفاده شده است (۱۲). به دلیل این که این داروها در مناطق مختلف جغرافیایی و در مقابله با گونه‌های متفاوت از انگل طیف متفاوتی از تأثیر نشان می‌دهد و همچنین به علت بوجود آمدن مواردی از مقاومت دارویی و (۱۳) عوارض جانبی آن‌ها مانند بی‌اشتهایی، درد عضلانی، درد مفاصل، سمیت دارویی و تزریق طولانی مدت دارو، تلاش برای دستیابی به داروهای جدیدی که بتواند ضمن این که زخم را سریع‌تر بهبود بخشد عوارض جانبی کم‌تری داشته باشد همچنان ادامه دارد (۱۴).

دستیابی به داروهای جایگزین در دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بیشتر این داروها که به صورت خوراکی و یا موضعی هستند (۱۵)، علاوه بر استفاده آسان و هزینه کم‌تر عوارض جانبی کم‌تری نیز دارد. از جمله این داروهای موضعی داروهای سنتی با منشأ گیاهی هستند که اخیراً توجه زیادی به آن‌ها شده است (۱۶).

به همین دلیل در این مطالعه از پماد سنتی سالک با کد H.H.1125 برای درمان ضایعات جلدی در مدل حیوانی استفاده شد. از سه جنبه متفاوت می‌توان این دارو را با سایر داروهای که درمان لیشمانیوز به کار می‌روند مقایسه نمود:

کرد. همچنین ایمونوتراپی با BCG در حاملگی و یا افراد حساس به این ماده محدودیت مصرف دارد. با توجه به گیاهی بودن منشأ پماد مورد مطالعه و عدم ایجاد عوارض جانبی به نظر نمی‌رسد که محدودیتی در مصرف آن وجود داشته باشد.

نتیجه گیری

در مجموع به دلیل این‌که داروی مورد مطالعه از نظر اثر بخشی یک داروی مفید و موثر آن از ترکیبات گیاهی است و با توجه به کم هزینه و در دسترس بودن آن و عدم وجود عوارض و نیز استفاده آسان، به نظر می‌رسد این دارو خصوصیات یک داروی مناسب را دارا باشد. بنابراین با تکرار آزمایش‌های مشابه در دوره‌های درمانی متفاوت می‌توان مؤثرترین دوز و کوتاه‌ترین دوره را انتخاب کرد و پس از استاندارد کردن آن به عنوان یک روش درمانی مناسب در درمانگاه از آن استفاده کرد.

التیام یافت. این نتایج می‌تواند بیانگر بالا بودن میزان اثر بخشی پماد H.H.1125 باشد.

۲- بررسی عوارض جانبی

علاوه بر داروهایی که به صورت سیستمیک استفاده می‌شوند، داروهای موضعی نیز می‌توانند عوارضی را از خود به جا بگذارند. MBCL که معمولاً همراه با پاراموماسین استفاده می‌شود باعث التهاب شدید در پوست می‌شود (۲۱). علاوه بر آن خود پاراموماسین نیز گاه می‌تواند التهاب و قرمزی در موضع ایجاد کند (۲۱، ۲۲). در صورتی که در مطالعه حاضر هیچ‌گونه آثار سوء جلدی در حیوانات مورد مطالعه ناشی از استفاده از پماد مشاهده نگردید.

۳- عدم ممنوعیت با محدودیت استفاده

با توجه به عوارض جانبی فراوان در داروهای سیستمیک گاه نمی‌توان این داروها را در بعضی بیماران استفاده کرد. به طوری که مثلاً از گلوکانیتم نمی‌توان در نارسایی شدید کلیه و کبد استفاده

References:

1. Mauel J. Vaccination against Leishmania infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002;2(3):201-26.
2. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(3):239-43.
3. Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. *Biomed Pharmacother* 2007;61(2-3):148-53.
4. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004;10(6):307-15.
5. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002;8(4):319-42.
6. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997;24(4):684-703.
7. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania parasitised* RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* 2005;66(17):2056-71.
8. Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*. 2009; 80(2):81-90.
9. Monzote L, Montalvo AM, Almanonni S, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy* 2006;52(3):130-6.
10. Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep* 2001;18(6):674-88.
11. Mussi SV, Fernandes AP, Ferreira LA. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol Res* 2007;100(6):1221-6.
12. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 1996;34(2 Pt 1):257-72.

13. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(5):456-65.
14. Berman J. Recent developments in Leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2005;7(1):33-8.
15. Arana B, Rizzo N, Diaz A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: a review. *Med Microbiol Immunol* 2001;190(1-2):93-5.
16. Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007;49(4):257-60.
17. Kim DH, Chung HJ, Bleys J, Ghohostani RF. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? a meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3(2):e381.
18. El-On J, Jacobs GP, Witztum E, Greenblatt CL. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26(5):745-51.
19. Grogl M, Schuster BG, Ellis WY, Berman JD. Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and gentamicin. *J Parasitol* 1999;85(2):354-9.
20. Lynen L, Van Damme W. Local application of diminazene aceturate: an effective treatment for cutaneous leishmaniasis? *Ann Soc Belg Med Trop* 1992; 72(1):13-9.
21. Carter KC, Alexander J, Baillie AJ. Studies on the topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis: the therapeutic effect of methyl benzethonium chloride and the aminoglycosides, gentamicin and paromomycin. *Ann Trop Med Parasitol* 1989;83(3):233-9.
22. Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103(7):653-60.