مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال یازدهم ● شماره ۱ ● صفحات ۱ تا ۱۰ ● بهار ۱۳۹۲

اثر بیوشیمیایی داروی ال– آرژنین (L- Arg) به عنوان پیش ساز نایتریک اکساید و تاثیر مهارکنندگی ایندومتاسین (INDO) بر پروستاگلاندین (PG) در فیزیوپاتولوژی موش‌های حساس Balb/c آلوده به لیشمانیا ماژور

*فاطمه قاسمی[۱]، حسین نهروانیان[۲]

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۹۱/۷/۴ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۹۱/۹/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیوز به انواع احشایی، جلدی وجلدی- مخاطی قابل تفکیک است. لیشمانیا ماژوریکی از عوامل لیشمانیوز جلدی می‌باشد. این مطالعه جهت بررسی اثر بیوشیمیایی داروی ال- آرژنین به عنوان پیش ساز اکسید نیتریک در موش‌های Balb/c آلوده به لیشمانیا ماژور و تاثیر مهار کنندگی ایندومتاسین بر پروستاگلاندین صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی موش‌های Balb/c و انگل لیشمانیا ماژور صورت گرفت. در این مطالعه ۴۸سر موش Balb/c در ۶ گروه هشت تایی مورد استفاده قرار گرفت.۱- گروه کنترل سالم که شامل موش‌های سالم۲ – گروه کنترل آلوده، شامل موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور، تحت درمان با اتانول ۳ – گروه آزمون، شامل موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور، تحت درمان با ایندومتاسین ۴ – گروه کنترل آلوده، شامل موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور، تحت درمان با آب مقطر۵- گروه آزمون شامل: موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور، تحت درمان با ال- آرژنین ۶- گروه شاهد شامل موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور، تحت درمان با ایندومتاسین و ال- آرژنین انجام شد. میزان غلظت نایتریک اکساید بوسیله سنجش گرایس، اندازه گیری شد. و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA One Way و Student›s t-test مورد آنالیز قرار گرفت. این مقاله برگفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

یافته‌ها: غلظت نایتریک اکساید در گروه۴ ۱۵۷/۲±۲۲/۳۷ µM/ml، در صورتی که در گروه درمانی ال- آرژنین، ایندومتاسین یعنی گروه ۶ این میزان به ۶۲/۰۶±۱۳/۸۸ µM/ml کاهش یافت. آنالیز داده‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در میزان نایتریک اکساید سرم خون مربوط به گروه شاهد و آزمون در اثر درمان با ال- آرژنین، ایندومتاسین می‌باشد. قطر زخم‌ها در گروه شاهد ۶/۵۱±۱/۲۵ میلی‌متر بوده در حالی‌که در گروه تحت درمان به وسیله ایندومتاسین، این میزان به ۴/۲۹±۰/۹۵ میلی‌متر کاهش یافت.

بحث ونتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که بکارگیری ایندومتاسین و ال- آرژنین موجب تغییر میزان پروستاگلاندین ونایتریک اکساید در میزبان وآشکار شدن نقش تعاملی آنها در فیزیوپاتولوژی موش‌های آلوده به لیشمانیا شد که شامل طول دوره بیماری، خصوصیات ماکروسکوپی واندازه زخم لیشمانیایی واسپلنومگالی می‌باشد.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، نایتریک اکساید، ال-آرژینین، ایندومتاسین

مقدمه

لیشمانیوز پوستی یک عفونت مزمن و بیماری گرانولوماتوز است که به وسیله انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود. بر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، در ۸۸ کشورآلوده به این انگل، حدود ۱۲ میلیون

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی (*نویسنده مسئول)
تلفن: ۰۲۱-۸۵۹۵۲۲۰۲ آدرس الکترونیک: elhamgha_2007@yahoo.com
۲- استادیار، ایران، تهران، بخش انگل شناسی و انستیتو پاستورایران، بخش انگل شناسی

www.SID.ir

انسان آلوده وجود دارد و حدود ۳۵۰ میلیون انسان را خطر ابتلا به این بیماری تهدید می‌کند (۱). علی‌رغم تمام تلاش‌های انجام شده هنوزیکی ازمشکلات بهداشتی جهان ومنطقه می‌باشد (۲). انگل لیشمانیا یک پاتوژن داخل سلولی است که می‌تواند باعث طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی از یک زخم پوستی تا عفونتهای احشایی را سبب شود (۳). که با گزش پشه خاکی آلوده به میزبان پستانداراز جمله انسان منتقل می‌شود.

چرخه زندگی تمام گونه‌های لیشمانیا شامل دو مرحله است: یکی مرحله تاژک دار و به عبارتی پروماستیگوت‌های متحرک که قادرند در بیرون سلول‌های معده پشه خاکی زندگی کنند و مرحله بعد هم در سلول‌های پستانداران که پروماستیگوت‌ها درون ماکروفاژهای میزبان مهره دار به فرم آماستیگوت تبدیل می‌شوند (۴).

حساسیت ومقاومت به عفونت لیشمانیایی هستندکه به خصوص در بیماری‌های حاصل ازلیشمانیا ماژور (L. major) بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. سویه موش‌های CBA، C۵۷BL/۶ آلوده به L. major زخم‌های پوستی که به‌طور خودبه خودی بهبود می‌یابند را ایجاد می‌کنند، در حالی که موش‌های BALB/c، DBA/۲ زخم‌های پوستی اولیه ناعلاج را ایجاد کرده وبسیار حساس هستند (۵، ۶).

مقاومت وحساسیت نسبتا به پیشرفت پاسخ‌های سلول‌های T از نوع Th۱ و Th۲ مرتبط هستند. در موش‌های گونه C۵۷BL/۶ پاسخ ایمنی Th۱ افزایش می‌یابد که مانع از رشد بیشتر انگل وموجب بروز فنوتیپ خود درمانی می‌شود. در حالی که در موش‌های گونه BALB/c پاسخ‌های Th۲ افزایش می‌یابد که سبب ایجاد زخم‌های ناعلاج وپیشرفت بیماری می‌شود (۷) سلول‌های موش‌های مقاوم، IL-۱۰، IFN-γ ونیتریک اکساید (NO) بیشتری تولید می‌کنند از طرفی سلول‌های موش‌های حساس اینترلوکین، پروستاگلاندین ($PGE_۲$) و TGF-B بیشتری تولید می‌کنند (۸)، در نتیجه الگوی متغیری را در این دو میزبان متفاوت نمایان می‌سازد.

القای نیتریک اکساید سنتتاز II سلولهای $Th_۱$ CD‡ فعال شده، TNF-α، IFN-γ را القا کرده که سبب فعال سازی ماکروفاژها والقا نایتریک اکساید سنتتاز II (NOSII) و کشته شدن انگل از طریق تولید NO می‌شود، در حالی که گونه موش BALB/C مستعد با دارا بودن پاسخ $Th_۲$ اولیه، زخم‌هایی دارد که به‌طور خودبخود درمان نشده و بنابراین در این گونه پیشرفت می‌کند (۹). NO می‌تواند از اسید آمینه ال – آرژنین (L-Arg) به وسیله آنزیم نایتریک اکساید (NOS) سنتتاز تولید شود (۱۰). که در این واکنش ال – آرژنین به ال – سیترولین تبدیل می‌شود. شواهدی مبنی بر اینکه NO در فعالیت ضدمیکروبی ماکروفاژها بر علیه تعدادی از پاتوژن‌های درون سلولی دخالت می‌کند، وجود دارد آن پیشنهادکننده اینست که افزایش سطح NO در زخم‌های لیشمانیایی سبب کاهش تعداد انگل می‌شود (۱۱).

مسیر سیکلواکسیژناز (Cox: Cyclooxygenase) متابولیسم اسید آراشیدونیک، منجر به تولید پروستاگلاندین‌ها می‌شود. پروستاگلاندین‌ها (PG) حاوی یک حلقه پنج کربنه در زنجیره اسید آراشیدونیک می‌باشند. با کشف ایزوزوم‌های (Cox-۱, Cox-۲) مشخص گردید که این ایزوفرم‌ها تنظیمات وعملکردهای متفاوتی را نشان می‌دهند. Cox-۱ نقش هومئوستاتیک داشته، وبه‌طور قابل ملاحظه‌ای در تعدادی از انواع سلول‌ها بیان می‌شود. در حالی که Cox-۲ یک پاسخ ژنی اولیه است که در تعداد کمی از بافت‌ها مثل کلیه ونخاع یافت می‌شود (۱۲).

فعالیت ضد التهابی، داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی NSAIDها عمدتا به واسطه مهار بیوسنتز پروستاگلاندین‌ها اعمال می‌گردد. مهار کننده‌های COX-۲شامل:سلکوکسیب،روفکوکسیب ووالدکوکسیب، ومهارکننده‌های COX-۱شامل آسپیرین، ایندومتاسین، پیروکسیکام وسولینداک می‌باشند در حالی که ایبوپروفن ومکلوفنامات، هردو ایزوآنزیم را به یک نسبت مهار می‌کنند (۱۳).

ایندومتاسین در سال ۱۹۶۳ معرفی شد. این دارو یک مهار کننده قوی COX است. با کاهش آنزیم‌های لازم، سنتز پروستاگلاندین را مهار کرده و به وسیله مهار سنتز پروستاگلاندین‌ها اثرات تسکینی وضد التهابی و ضد تب ایجاد می‌کند (۱۴، ۱۵). مطالعه حاضر، نخستین طرح در خصوص بررسی گونه ایرانی لیشمانیا ماژور سویه MRHO/ IR/ ۷۵/ ER و ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی، پارازیتولوژیک، پاتوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی L- Arg به عنوان داروی پیش سازنیتریک اکساید و ایندومتاسین به عنوان مهار کننده PG، در یک مطالعه واحد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوان آزمایشگاهی استفاده شده

موش Balb/c (inbred) نر (تهیه شده توسط واحد حیوانات آزمایشگاه

Archive of SID
www.SID.ir

انستیتو پاستور کرج) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. وزن اولیه بدن g ۱/۳±۱۸/۲ میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) بوده وموش‌ها درون اتاقی با درجه حرارت (°C ۲۳ – ۲۰) و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با دسترسی نامحدود به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایش‌ها روی حیوانات بر طبق استانداردهای اخلاقی بیانیه Helsinki انجام شد و روش‌هایی برای حفاظت حیوانات از درد و ناراحتی مورد استفاده قرار گرفت.

انگل استفاده شده

انگل استفاده شده در این مطالعه Leishmania major گونه استاندارد ایران (MRHO/IR/۷۵/ER) است. که در بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران نگهداری می‌شود. برای کشت این فرم انگل از محیط دو فازی NNN برای جداسازی اولیه انگل از زخم موش Balb/c استفاده شد وسپس کشت انگل در محیط FCS ٪۱۰ + ۱۶۴۰ RPMI عاری از سلول انجام گرفت. قابلیت عفونت زایی انگل‌ها به وسیله پاساژ منظم در موش Balb/c مستعد حفظ شده و انگل‌ها در محیط نگه دارنده ۱۶۴۰ PRMI کشت داده شده‌اند. تحت چنین شرایط کشتی، فاز ایستایی رشد انگل در روز ششم به دست آمده است.

کشت انگل L. major و آلوده سازی حیوانات با انگل

در این مطالعه به موش‌های Balb/C پروماستیگوت L. major در RPMI بدون FCS به صورت زیر جلدی (s.c.) در قاعده دم حیوان تزریق گردد که به زخم نسبتا بزرگی تبدیل شد که سپس متاستاز یافته و حیوان را کاملاً آلوده کرد. بعد از بالا آمدن زخم، به هر یک از گروههای آزمون غلظت مطلوب از داروی مورد نظربر حسب (mg/Kg/BW) را تجویز کردیم.

گروه‌ها و آزمایش‌ها

تعداد کل حیواناتی که در این مطالعه استفاده شد، ۴۸سر موش Balb/c در۶ گروه (در هر گروه ۸ سرموش) که بجز گروه ۱ بقیه گروه‌ها را با تزریق انگل L. major آلوده کردیم.

۱ـ گروه کنترل سالم (Naïve)، که شامل موش‌های Balb/c سالم، جهت مقایسه با گروه آلوده بوده است.

۲ـ کنترل آلوده، شامل موش‌های Balb/c آلوده به L. major، که تحت درمان با اتانول ٪۰/۴، به صورت خوراکی در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی استفاده شد.

۳ـ گروه آزمون شامل موش‌های آلوده به L. major، که تحت درمان با دوزهای g ۰/۰۸، ۰/۰۴ ایندومتاسین، در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی استفاده شد.

۴ـ کنترل آلوده، شامل موش‌های Balb/c آلوده به L. major، که تحت درمان با آب مقطر، به صورت در هفته هفتم به جای آب آشامیدنی استفاده شد.

۵ـ گروه آزمون شامل موش‌های آلوده به L. major، که تحت درمان با دوزهایg ۰/۱، ۰/۲ال- آرژنین، به صورت خوراکی در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی انجام شد.

۶ـ گروه شاهد شامل موش‌های آلوده به L. major، که تحت درمان با دوزهای g ۰/۰۸، ۰/۰۴ ایندومتاسین و دوزهای g ۰/۱، ۰/۲ ال- آرژنین در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی انجام شد.

اندازه گیری وزن بدن

وزن بدن برحسب گرم پس از تلقیح انگل هر هفته، با استفاده از یک ترازوی کفه بالا اندازه گیری شد.

ارزیابی میزان هپاتواسپلنومگالی

پس از کشتن موش‌ها به وسیله دی اتیل اتر، در شرایط سترون طحال وکبد از بدن خارج و درون میکروتیوپ قرار گرفته و وزن‌تر ارگان به وسیله ترازوی دیجیتال اندازه گیری شد و به عنوان شاخص میزان هپاتومگالی و اسپلنومگالی با گروه شاهد (L. major) با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA One Way و Student›s t-test مورد آنالیز قرار گرفتند (۱۷).

اندازه‌گیری میزان بقا

Survival rate بیانگر درصد بقای موش‌های آزمایش درهرهفته بعد از تزریق است که تفاوت‌ها به وسیله نرم افزار Graph Pad Prism رسم ومورد مقایسه قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه گیری زخم

اندازه زخم به صورت هر هفته بعد از ظهور زخم به وسیله کولیس مدرج دیجیتال برحسب میلی‌متر (mm) و در دو بعد افقی و عمودی (D,d) اندازه گیری شد و اندازه (mm) بر طبق فرمول S= (D+d) /۲ تعیین گردید (۱۷). که این عمل هر هفته پس ازظاهر شدن زخم‌ها به مدت ۶ هفته متوالی صورت گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism رسم و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA One Way و Student›s t-test مورد آنالیز قرار گرفتند.

آماده سازی سرم و سوسپانسیون بافتی

جهت جداسازی سرم موش‌های هر شش گروه را به طریقه بیهوشی منجر به مرگ کشته و از قلب آنها به وسیله سرنگ انسولین، در حدود ml ۱ خونگیری کردیم. نمونه خون را به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ در دستگاه میکروفیوژ قرار داده و سپس به وسیله سمپلر محلول رویی آن را جدا کردیم، بدین ترتیب سرم خون حاصل شد. به منظور تهیه سوسپانسیون از نمونه‌های بافتی به دست آمده (کبدو طحال) میزان gr ۰/۱ از بافت طحال و gr ۰/۲ از بافت کبد را بوسیله تیغ و ترازوی دیجیتال جدا کرده و با استفاده از دستگاه هموژنایزر درون میکروتیوپ کاملا هموژنیزه کرده، پس از افزودن cc ۱ آب مقطر استریل (DW) به آن، در نهایت سوسپانسیون حاصله را درون Shaker قرار داده تا کاملا یکنواخت شود. برای اندازه گیری میزان RNI در یک گرم (µM/g Wet Weight of Liver/Spleen) از بافت کبد و طحال نتایج آزمایش را به ترتیب برای کبد و طحال ۵ و ۱۰ برابر کردیم. و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA One Way و Student›s t-test مورد آنالیز قرار گرفتند.

Griess Micro Assay (GMA)

واکنش گرایس همراه با تغییراتی از روشی که توسط نهروانیان و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای سنجش نیتریت بکار رفته، اقتباس شده است. نیتریت ($NaNO_2$) به‌طور مستقیم بوسیله سنجش گرایس، با استفاده از محلول گرایس و TCAA، اندازه گیری شد (۱۷).

رسم منحنی استاندارد و روش انجام واکنش گرایس

به منظور تعیین اثر داروی ال- آرژنین و ایندومتاسین بر غلظت واسطه‌های نیتروژن فعال (RNI) در سرم خون و سوسپانسیون‌های کبد و طحال مربوط به هر یک از گروه‌های آزمون و شاهد، ابتدا محلولهایی استاندارد را با ۱۰ غلظت مختلف $NaNO_2$ تهیه و منحنی استاندارد آنرا رسم کردیم، بدین طریق که ابتدا درون ۱۰ اپندروف (۱/۵ میلی لیتر) میزان µL ۲۰۰ آب مقطر استریل ریخته و سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول $NaNO_2$ یک میلی مولاربه اپندورف اول اضافه کرده و از آن پس، هر بار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اول را جایگزین همین مقدار محلول در اپندورف‌های بعدی کردیم و در نهایت از لوله آخر ۲۰۰ میکرولیتر از محلول را بدور ریختیم. غلظت‌های نهایی حاصل برای $NaNO_2$ به ترتیب و ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸، ۳/۹، ۱/۹۵ و ۰/۹ µM در هر یک از ۱۰ لوله استاندارد می‌باشد. سپس به هر یک از لوله‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول گرایس (اسید فسفریک ۵ ٪، سولفانیلیک اسید ۱ ٪ و N (۱ – نفتیل – ۱) اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید، (NED اضافه کردیم و به مدت ۵ دقیقه درون Shaker قرار دادیم تا بخوبی مخلوط شد. محلول نهایی حاصل را به مدت ۵ دقیقه و RCF ۱۳۰۰ درون سانتریفیوژ قرار داده و از مایع رویی لوله‌ها، ۱۵۰ میکرولیتر برداشته و به وسیله سمپلر ۲۰۰، به درون چاهک‌های ته صاف میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در یک ردیف منتقل کردیم. جذب محلول‌های استاندارد را در nm ۵۲۰ با استفاده از دستگاه قرائت گر میکروپلیت (micro plate reader) خواندیم و در نهایت منحنی استاندارد محلول نیتریت سدیم ($NaNO_2$) که در غلظت‌های مشخص دارای جذب معینی می‌باشد، رسم گردید. بدین ترتیب، در نمونه‌های سرم و سوسپانسیون‌های کبد و طحال با RNI نامشخص، جهت تعیین مقدار نیتریت میتوان از این منحنی استاندارد استفاده کرد.

در مرحله بعدی، به منظور تعیین مقادیر RNI در نمونه‌های مجهول بیماران، ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم خون موش‌های آلوده گروه‌های T و C را با ۵۰ میکرولیتر واکنشگر گرایس مخلوط کرده و پس از قرار دادن درون Shaker و انکوبه کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، پروتئینهای آن با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر (TCAA)تری کلرواستیک ۱۰٪ ته نشین شد. محلول حاصله مانندمرحله تولید محلول استاندارد، به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰ دور سانتریفیوژ قرار گرفت و از محلول رویی آن ۱۵۰ میکرولیتر برداشته و درون میکروپلیت وارد کردیم و پس از اندازه گیری جذب نوری نمونه‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

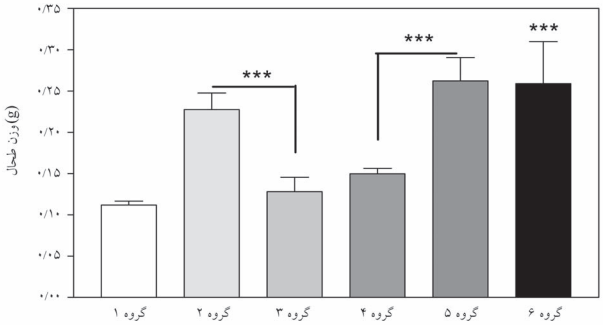
در nm ۵۴۰ با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده، میزان غلظت RNI تعیین گردید. پس از تعیین غلظت RNI، نتایج به وسیله نرم افزار Graph Pad Prism رسم واطلاعات خام حاصله با روش‌های آماری t-test student's و One Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت.

روش Enzymatic جهت اندازه گیری میزان پروستاگلاندین: پروستاگلاندین بر اساس روش آنزیماتیک ایمونواسی High) Sensitivity Prostaglandin E۲ Enzyme Immunoassay Kit) مورد ارزیابی قرار گرفت در این روش از آنزیم و سوبسترا استفاده شد و در انتهای روش Optical Density نمونه‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با دستگاه اکسپکتروفوتومتر خوانده شدند. نتایج با روش‌های آماری t-test student's و One Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند (۱۸).

یافته‌ها

باتوجه به غلظت موثر و ضد لیشمانیایی داروی L -آرژنین و ایندومتاسین با درنظر گرفتن ظرفیت تحمل حیوان زنده و عوارض جانبی احتمالی دارو، از دو غلظت دارویی شامل g ۰/۱ در هفته اول و g ۰/۲ در هفته دوم مطالعات برای ال-آرژنین وهمچنین از ایندومتاسین هم با دو غلظت دارویی شامل g ۰/۰۴ در هفته اول و g ۰/۰۸در هفته دوم مطالعات استفاده شد.

ارزیابی اسپلنومگالی در گروه‌های آزمون و شاهد: ازعلایم پاتوفیزیولوژیکی اسپلنومگالی است که در همه گروه‌های شاهد وآزمون مورد ارزیابی قرار گرفت. (شکل ۱) میانگین وزنی



شکل ۱- بررسی عوارض پاتوفیزیولوژیک (اسپلنو مگالی) در گروه‌های آزمون و شاهد

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L- Arg)، گروه ۶ (L. major + L- Arg + INDO)

بافت طحال، در گروه ۲به‌عنوان گروه شاهد از ۰/۰۲۰±۰/۲۲۷ به ۰/۰۱۷±۰/۱۲۸، در گروه آزمون یعنی گروه ۳ کاهش یافت یعنی ایندومتاسین در این غلظت، تاثیر پاتوفیزیولوژیک معنی‌داری بر طحال موش‌های گروه آزمون با گروه شاهد داشت. L-آرژنین در گروه ۴به عنوان گروه شاهد از ۰/۰۰۶±۰/۱۴۹ به ۰/۰۲۸±۰/۲۶۲، در گروه آزمون یعنی گروه ۵ افزایش یافت. که افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت. و همچنین ترکیب دارویی L-آرژنین و ایندومتاسین در گروه ۶ به‌عنوان گروه آزمون از ۰/۰۰۶±۰/۱۴۹ در گروه ۴ و ۰/۰۲۰ ±۰/۲۲۷ در گروه ۲، به عنوان گروه‌های شاهد، به ۰/۰۵۱ ±۰/۲۵۹ در گروه آزمون یعنی گروه ۶ افزایش یافت. که افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های شاهد داشت. (شکل ۱) آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و Student' s t-test تفاوت معنی‌داری در میزان اسپلنومگالی بین دو گروه شاهد و آزمون نشان داد. اختلاف معنی‌داری(P<۰/۰۰۱***) بین گروه‌های شاهد و آزمون آلوده به لیشمانیا ماژور مشاهده شد.

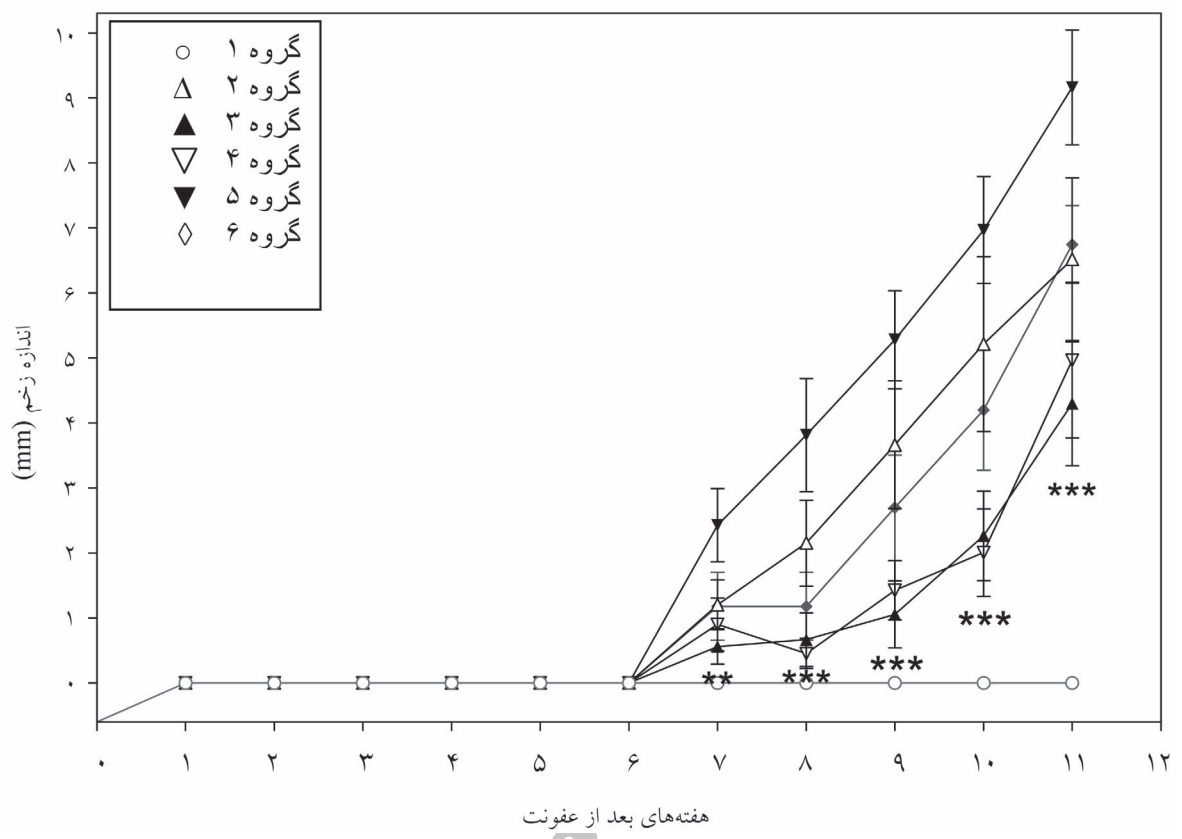
بررسی مقایسه‌ای اندازه زخم (Lesion Size) در گروه‌های آزمون و شاهد

پس از اندازه گیری قطر زخم‌ها در دو بعد، میانگین قطر زخم‌ها در گروه شاهد ۱/۲۵±۶/۵۱ میلی متر بوده در حالی که در گروه آزمون تحت درمان به وسیله ایندومتاسین، این میزان به ۰/۹۵±۴/۲۹ میلی متر کاهش یافته است. تفاوت معنی‌داری در مقایسه قطر زخم‌های گروه درمانی ایندومتاسین و همچنین گروه شاهد پس از درمان مشاهده شد. واختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۰۱***) از طریق تست Student' s t-test به دست آمد. (شکل ۲) همچنین میانگین قطر زخم‌ها در گروه ۴ به عنوان شاهد در روز هفته یازدهم پس از تلقیح ۰/۹۵±۴/۹۶ میلی متر بود در حالی که در گروه ۵ به عنوان آزمون درمان شده به وسیله L-آرژنین، این میزان به ۰/۹۷±۹/۱۶ میلی‌متر افزایش یافت. (شکل ۲)

سنجش RNI در نمونه‌های سرم خون گروه‌های آزمون و شاهد به روش میکروگرایس (GMA)

در اندازه گیری‌های انجام شده میانگین غلظت RNI در گروه ۲ µM/ml ۱۸/۴۱ ± ۱۲۷/۱۱، ودر گروه ۴ µM/ml ۲۲/۳۷ ± ۱۵۷/۲، به عنوان

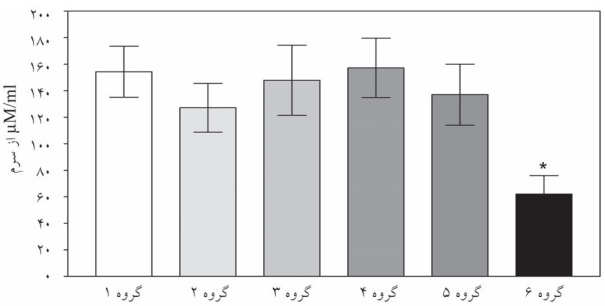
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- پیشرفت اندازه زخم‌های لیشمانیوز پوستی در گروه‌های آزمون و شاهد

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)

گروههای شاهد بوده در صورتی که در گروه درمانی ایندومتاسین، L-Arg یعنی گروه ۶ (آزمون) این میزان به ۱۳/۸۸±۶۲/۰۶ میکرومول بر میلی لیتر کاهش یافت آنالیز آماری داده‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در میزان RNI سرم خون مربوط به گروه شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین، L-آرژنین بود. (شکل ۳) آنالیز آماری داده‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در غلظت RNI سرم با P*< ۰/۰۵ بین موش‌های گروه شاهد و آزمون پس از درمان ایندومتاسین، L-آرژنین بود.



شکل ۳- سنجش RNI در نمونه‌های سرم خون موش‌های Balb/c در گروه‌های آزمون و شاهد

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)

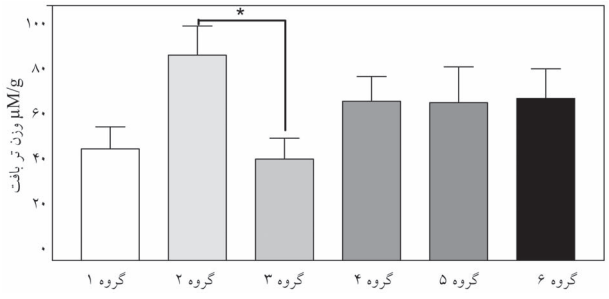
سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی کبد به روش میکروگرایس (GMA)

در مطالعات صورت گرفته با داروی ایندومتاسین، میانگین غلظت RNI در گروه ۲ شاهد ۷/۹±۵۶/۴۰ بوده در صورتی که در گروه ۳ (آزمون) این میزان به ۵/۶±۲۷/۸۹ میکرومول بر گرم کاهش یافت. آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی کبد، مربوط به این دارو بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین نشان داد. (شکل ۴) آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی کبد، با P*< ۰/۰۵ مربوط به داروی ایندومتاسین بین گروه‌های شاهد و آزمون نشان داد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism و آزمون Student's t-test انجام شد.

سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی طحال به روش میکروگرایس (GMA)

میانگین غلظت RNI در گروه ۲ به عنوان شاهد ۳/۱۱±۳۴/۵۹ بوده در

Archive
www.SID.ir

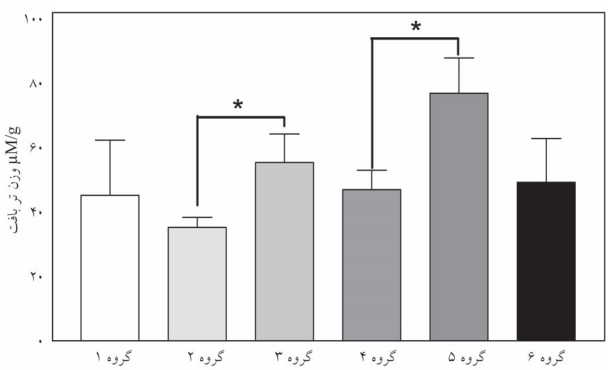


شکل ۴- سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی کبد موش‌های Balb/c در گروه‌های آزمون و شاهد به روش میکروگرایس (GMA)

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L- Arg)، گروه ۶ (L. major + L- Arg + INDO)

صورتی که در گروه ۳ به عنوان آزمون این میزان به ۸/۶۸±۵۴/۳۱ میکرومول بر گرم افزایش یافت. که آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی طحال، مربوط به این دارو با P*< ۰/۰۵، بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین نشان داد. همچنین در مطالعه بر روی داروی L-آرژنین، میانگین غلظت RNI در گروه ۴ به عنوان شاهد ۵/۹۳±۴۶/۰۱ بوده در صورتی که در گروه ۵ به عنوان آزمون این میزان به ۱۰/۷۹±۷۵/۴۱ میکرومول بر گرم افزایش یافت. که آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی طحال، مربوط به این دارو با P*< ۰/۰۵، بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با L-آرژنین نشان داد. (شکل ۵)

ترکیب دارویی ایندومتاسین، L-آرژنین میانگین غلظت RNI در گروه‌های شاهد ۸/۶۸ ±۵۴/۳۱ و ۵/۹۳±۴۶/۰۱ بوده در صورتی که در گروه ۶ درمانی با ایندومتاسین، L-آرژنین به عنوان آزمون این میزان به ۱۳/۳±۴۸/۲۹ میکرومول بر گرم افزایش یافت. (شکل ۵)



شکل ۵- سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی طحال موش‌های Balb/c به روش (GMA)

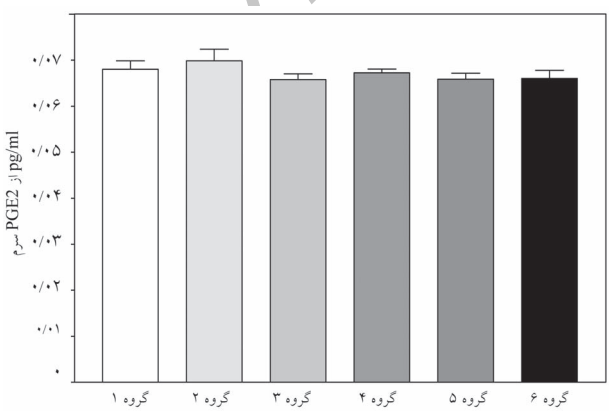
گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L- Arg)، گروه ۶ (L. major + L- Arg + INDO)

آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی طحال، مربوط به این داروها بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین، L-آرژنین نشان داد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism و آزمون Student's t-test انجام شد.

بررسی تاثیر دارویی ایندومتاسین INDO، بر میزان پروستاگلاندین (PG) در نمونه‌های سرم خون مربوط به گروه‌های آزمون و شاهد به روش الایزا

میزان غلظت PG در گروه ۲ به عنوان شاهد آلوده به L. major نسبت به گروه ۳ به عنوان آزمون آلوده به L. major به وسیله آنالیز آماری داده‌ها تفاوت معنی‌داری را در این مورد نشان نمی‌داد. به‌طوری که آنالیز آماری نتایج با استفاده از آزمون آماری Student's t-test و برنامه کامپیوتری Graph pad prism نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در این خصوص نبود. در بررسی‌های انجام شده، میانگین میزان PG در سرم خون مربوط به گروه‌های شاهد و آزمون به ترتیب ۰/۰۰۲±۰/۰۷۰ و ۰/۰۰۱ ± ۰/۰۶۶ بود. (شکل ۶)

غلظت PG در هر یک از نمونه‌ها براساس منحنی جذب و برحسب پیکوگرم بر میلی لیتر (pg/ml) بیان شد. آنالیز آماری داده‌ها نشان دهنده تاثیر قابل ملاحظه ایندومتاسین بر میزان PG در نمونه سرم گروه آزمون در مقایسه با گروه شاهد نبود. این در حالی است که آلودگی به L. major نیز سبب بالا بردن میزان PG در گروه بیمار بدون درمان



شکل ۶- میزان PG نمونه‌های سرم خون موش‌های Balb/c، گروه‌های آزمون و شاهد به روش الایزا

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L- Arg)، گروه ۶ (L. major + L- Arg + INDO)

Archive of SID
www.SID.ir

(شاهد) در مقایسه با موش‌های سالم شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism و آزمون Student's t-test انجام گرفت.

نتایج و بحث

در بررسی اسپلنومگالی کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱***) بین گروه‌های شاهد و آزمون آلوده به لیشمانیا ماژور (شکل ۱) نشان دهنده آن است که ایندومتاسین در این غلظت، تاثیر پاتوفیزیولوژیک معنی‌داری بر طحال موش‌های گروه آزمون در مقایسه با گروه شاهد داشته است. این امر می‌تواند نشانگر تأثیرضد لیشمانیایی بسزا و مشخص ایندومتاسین در درمان بیماری و بازگشت به وضعیت نرمال که نشان دهنده عوارض جانبی کم، ومهار انگل توسط این دارو بوده است. و از این نظر موجب کاهش اسپلنومگالی گردیده است. ونتیجه‌ای که ارائه شده است با کنترل گروه ۴ (آب مقطر بعنوان حلال دارویی به آنها داده شده است) تقریبا یکسان می‌باشد.

بررسی اثر ضد لیشمانیایی L-Arg و INDO

با درنظر گرفتن این موضوع، مشاهده شد که در گروه ۳ ایندومتاسین پس از ۲ هفته درمان سبب بیشترین کاهش قطر زخم ناشی از L. major در موشهای مستعد شد. این امر می‌تواند نشانگر تأثیر مثبت ایندومتاسین در مهار پروستاگلاندین، و در درمان بیماری و بازگشت به وضعیت نرمال باشد. ولی احتمالا تاثیر NO به صورت نرمال می‌باشد. (شکل ۲)

در این مطالعه ما از موش های Inbred (همخون) Balb/c استفاده نموده ایم که عدم تناقض در مستعد بودن به لیشمانیا و فنوتیپ غیر خود محدود شونده آنها در مقالات متعدد به خوبی نشان داده شده است (۸، ۱۸). سیستم Th_2 در غیاب Th_1 مسئول حساسیت سیستم ایمنی بوده و در موش‌های Balb/c مستعد سبب متاستاز انگل به درون بدن و در نهایت مرگ جاندار می‌شود. در حالی که در گونه‌های مقاوم شاهد ایمنی لیشمانیا طی یک پاسخ Th_1 عمده منجر به فعال شدن ماکروفاژها و حذف انگل درون سلول از طریق القا (NOS II) و تولید NO می‌شود (۲۰).

تغییرات مربوط به القای NO در بافت کبد با روش GMA حاکی از کاهش سطح این واسطه ایمنی در گروه‌های آزمون پس از درمان با INDO (شکل ۴) در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. اگرچه که این کاهش به صورت معنی‌داری (P*< ۰/۰۵) تنها در سطح NO کبد مربوط به INDO دیده می‌شود. باتوجه به نتایج به نظر می‌رسد که کبد RNI را متابولیتی دفعی درنظر گرفته و با دفع آن سبب کاهش سطح آن گردیده است.

ولی الگوی تاثیر گذاری بر روند تولید NO به نظر می‌رسد که در کبد و طحال با یکدیگر متفاوت باشد. به‌طوری که INDO در کبد نقش بازدارنده تولید NO را بازی می‌کند. و L-Arg موجب افزایش میزان NO اما نه به شکل معنی‌دارشده است. در حالی که در طحال INDO و L-Arg باعث افزایش معنی‌دار میزان NO شده است. در گروه ۶ در طحال ترکیب درمانی توام موجب افزایش NO نسبت به گروه‌های کنترل مربوطه شده است.

داروی INDO در طحال (شکل۵) به شکل معنی داری (P*< ۰/۰۵) باعث افزایش میزان NO شده است. که نشان دهنده تاثیر مثبت این دارو در درمان عفونت با L. major است. در حالی که L-Arg در کبد بدون تغییردر میزان NO (شکل۴)، ولی در طحال باعث افزایش معنی‌داری NO با (P*< ۰/۰۵) می‌باشد. که نشان دهنده تاثیر مثبت این دارو در درمان از طریق افزایش میزان NO می‌باشد.

بررسی اثر L-Arg از نظر آزاد کنندگی نایتریک اکساید (NO)

در مقایسه دو گروه آزمون و شاهد از نظر سطح NO سرم، به عنوان مهم‌ترین واسطه سیستم ایمنی در حذف انگل L. major، انتظار داریم که L-Arg به سبب القا کنندگی NO اگزوژنوس در گروه آزمون موجب افزایش میزان NO در مقایسه با موش‌های آلوده در گروه شاهد گردد.

در بررسی سرم پس از درمان با L-Arg (شکل ۳)، درسطح NO تغییرمعنی‌داری مشاهده نگردیده است. این مطلب می‌تواند بیانگر کاهش سیستمیک تولید والقای NO توسط ماکروفاژها می‌باشدکه به دلایل مختلف صورت می‌گیرد یکی از دلایل سرکوب پروسه تولید NO توسط مکانیسم‌های انگل لیشمانیا می‌باشد که انگل توسط سیستم پس خوری تولید NO را قطع یا ضعیف می‌کند که بنا به افزایش تعداد ماکروفاژهای آلوده ومتلاشی شدن آنها عملا تعداد زیادی از سلول‌های تولید کننده NO از پروسه سیستم ایمنی حذف می‌شوند و با توجه به اینکه در کبد وطحال کمتر است بنابراین ماکروفاژها نقش بیشتری را در افزایش یا کاهش NO دارند. علاوه

Archive of SID
www.SID.ir

بر NO تولید شده توسط ماکروفاژها، گونه‌های لیشمانیا خودشان نیز قادر به تولید NO هستند (۲۲، ۲۱). به نظر می‌رسد که انگل دارای مکانیسم‌های ذاتی برای مقاومت نسبت به NO به منظور ممانعت توکسیسیتی از NO اندوژن هستند (۲۳). مطالعات نشان داده که آنزیم‌های سطح آماستیگوت از تولید NO جلوگیری و فعالیت ضدلیشمانیایی را کاهش می‌دهند (۲۴)، در حالی که INDO (شکل ۳) که با بهبود بیماری همراه بوده است، سطح NO در سرم را در گروه آزمون افزایش داده است. در نمونه‌های سرم ترکیب دو داروی INDO و L-Arg باعث کاهش معنی‌داری (P*< ۰/۰۵) در میزان NO شده است. (شکل ۳)

ترکیب دارویی توام INDO و L-Arg درگروه ۶ موجب مهار PG و NO گشته است. و این نشان دهنده این است که بکارگیری INDO که برای مهار PG بکار می‌رود موجب کاهش PG و تاثیر گذاری در مسیر (COX) که باعث پس خوران منفی در مسیر تولید NO توسط ماکروفاژها و اسپلنوسیت‌ها می‌باشد.

بررسی اثر INDO بر میزان PG سرم خون

به منظور بررسی بیوشیمیایی دارو، تاثیر INDO بر PG در سرم مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییرات در متابولیسم PG که قسمتی از پاسخ ایمنی در موش‌های حساس است می‌تواند باعث بهبودی یا افزایش عفونت شود. پیش تیمار ماکروفاژها با ایندومتاسین عفونت را از طریق مهار PG کاهش می‌دهد.مکانیسم سمی برای ماکروفاژها تشکیل NO را مهار می‌کنند. NO تولید شده در ماکروفاژها از طریق PG آزاد شده مهار می‌شود (۲۵).

استفاده از ممانعت INDO موجب کاهش مختصر تولید PG در گروه ۳ شده است (شکل ۶). ولی این کاهش به شکل معنی‌دار نبوده است. و احتمالا از دلایل عمده آن پایین بودن غلظت موثر، استفاده از روش خوراکی به جای روش تزریقی و بدمزه شدن آب خوراکی در اثر افزودن INDO که موجب کاهش استفاده از آب در حیوانات مورد مطالعه شده است. که به نظر می‌رسد به کارگیری روش‌های دیگر تجویز دارو شبیه استفاده از روش‌های تزریق می‌تواند موجب کاهش خطای این مطالعه گردد. وهمچنین تاثیر دارو سریع السیر و حداکثر تا ۳-۴ ساعت بعد از تجویز دارو می‌باشد.این نتایج نشانگر آن است که چون در موش‌های مستعد Balb/c ما بعد دو هفته درمان با ایندومتاسین موش‌ها را کشته و سرم آنها را جدا کردیم. بنابراین در این مدت زمان PGE_2 سرم می‌تواند متابولیزه شود.

باتوجه به مهار PG توسط ایندومتاسین در روند درمان بیماری و ایجاد شرایطی مشابه با سیستم ایمنی در فنوتیپ مقاوم، این افزایش سطح PG سرم با مقاومت حیوان حساس مورد آزمایش نسبت به L. major متناسب بوده است.

References

1- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005 Oct 29-Nov 4; 366 (9496): 1561-77. PubMed PMID: 16257344.

2- Wanasen N, MacLeod CL, Ellies LG, Soong L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of Leishmania amazonensis amastigotes in macrophages. Infect Immun 2007 Jun; 75 (6): 2802-10. PubMed PMID: 17387163. Pubmed Central PMCID: 1932894.

3- White JM, Salisbury JR, Jones J, Higgins EM, Vega-Lopez F. Cutaneous leishmaniasis: three children with Leishmania major successfully treated with itraconazole. Pediatr Dermatol 2006 Jan-Feb; 23 (1): 78-80. PubMed PMID: 16445420.

4- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 2006 Mar; 123 (3): 311-30. PubMed PMID: 16778313.

5- Bradley DJ. Letter: Genetic control of natural resistance to Leishmania donovani. Nature 1974 Jul 26; 250 (464): 353-4. PubMed PMID: 4852791.

6- Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to Leishmania major. Annu Rev Immunol 1995; 13: 151-77. PubMed PMID: 7612219.

7- Soares M, David JR, Titus RG. An in vitro model for infection with Leishmania major that mimics the immune response in mice. Infec Immun 1997; 65 (7): 2837-45.

8- Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of Leishmania major in C57BL/6 mice. J Immunol 2005 Mar 1; 174 (5): 2934-41. PubMed PMID: 15728505.

9- Nameda S, Saito M, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. Effect of nitric oxide on beta-glucan/indomethacin-induced septic shock. Biol Pharm Bull 2005 Jul; 28 (7): 1254-8. PubMed PMID: 15997109.

10- Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of Leishmania major infection in

Archive of SID

www.SID.ir

mice by enhancing in vivo nitric oxide production. J Immunol 1999 Jan 15; 162 (2): 974-9. PubMed PMID: 9916722.

11- Konger RL, Scott GA, Landt Y, Ladenson JH, Pentland AP. Loss of the EP2 prostaglandin E2 receptor in immortalized human keratinocytes results in increased invasiveness and decreased paxillin expression. Am J Pathol 2002 Dec; 161 (6): 2065-78. PubMed PMID: 12466123. Pubmed Central PMCID: 1850902.

12- Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. 9th ed. New York ; London: Lange Medical Books/McGraw Hill; 2004.

13- Khalili M, Narengkar J. The Role of Nitric Oxide and Prostaglandins in the Effect of Adenosine on Contractility, Heart Rate and Coronary Blood Flow in Guinea Pig Isolated Heart. Iranian Biomedical Journal 2005; 9 (4): 177-80. [Persian]

14- Lesho EP, Wortmann G, Neafie R, Aronson N. Nonhealing skin lesions in a sailor and a journalist returning from Iraq. Cleve Clin J Med 2005 Feb; 72 (2): 93-4, 6, 8-9 passim. PubMed PMID: 15757166.

15- Mittal J, Dogra N, Vohra H, Majumdar S. Effects of prostaglandin E2 and nitric oxide inhibitors on the expression of interleukin-10, interleukin-12 and MHC class-II molecules in Mycobacterium microti-infected and interferon-gamma-treated mouse peritoneal macrophages. Folia Microbiol (Praha) 2001; 46 (3): 259-64. PubMed PMID: 11702410.

16- Nahrevanian H, Farahmand M, Aghighi Z, Assmar M, Amirkhani A. 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 2007 Jul; 116 (3): 233-40. PubMed PMID: 17335813.

17- Lonardoni MV, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. Infect Immun 2000 Nov; 68 (11): 6355-61. PubMed PMID: 11035745. Pubmed Central PMCID: 97719.

18- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. Indian J Med Res 2004 Jun; 119 (6): 238-58. PubMed PMID: 15243162.

19- Holzmuller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, et al. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in Leishmania amazonensis amastigotes. Infect Immun 2002 Jul; 70 (7): 3727-35. PubMed PMID: 12065515. Pubmed Central PMCID: 128075.

20- Basu NK, Kole L, Ghosh A, Das PK. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, Leishmania donovani. FEMS Microbiol Lett 1997 Nov 1; 156 (1): 43-7. PubMed PMID: 9368359.

21- Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJ, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, et al. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in Leishmania amazonensis axenic amastigotes. Arch Med Res 2006 Apr; 37 (3): 328-33. PubMed PMID: 16513480.

22- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, et al. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. BMC Infect Dis 2007; 7: 7. PubMed PMID: 17316450. Pubmed Central PMCID: 1810296.

23- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell 1994 Sep 23; 78 (6): 915-8. PubMed PMID: 7522969.

24- Griffon B, Cillard J, Chevanne M, Morel I, Cillard P, Sergent O. Macrophage-induced inhibition of nitric oxide production in primary rat hepatocyte cultures via prostaglandin E2 release. Hepatology 1998 Nov; 28 (5): 1300-8. PubMed PMID: 9794915.

Archive of SID

www.SID.ir

Application of L-Arginine as nitric oxide inducer and Indomethacin as prostaglandin inhibitor in Balb/c mice infected with Leishmania major MRHO/IR/75/ER

*Ghasemi F[1], Nahrevanian H[2]

Received: 25 Sep 2012 Accepted: 5 Dec 2012

Abstract

Background: Leishmaniasis is one of the health problems in. This study is designed to inhibit PG production by Indomethacin and induce NO by L- Arginine precursor in L. major infected Balb/c mice.

Materials and methods: This was an experimental study. Animals, Male inbred Balb/c mice were used in this study. The total number of animals used in this experiment was 48 Balb/c mice, divided into 6 groups (n =8 mice/group) including Group 1 (naive), Group 2 (L. major + 0.4% Ethanol), Group 3 (L. major + Indomethacin), Group 4 (L. major + DW), Group 5 (L. major + L- Arginine) and Group 6 (L. major + Indomethacin + L-Arginine). In addition to serum, liver and spleen suspensions were investigated for NO induction by using Griess microassay. The data was analyzed by Analysis of Variances (ANOVA) and Student's t-test using Graph Pad Prism Software.

Results: The results indicated that production of NO was inhibited in infected Balb/c mice by L. major as compared with naive animals (Group 1). INDO as inhibitor PG (Group 2) showed their ability to elevate RNI levels in infect animals. INDO showed anti-leishmanial activity, as these compounds reduced the lesion sizes ($P<0.001$). INDO as inhibitor PG (Group 3) showed ability to decrease PG levels in infect animals.

Conclusion: Our data may indicate a possible role for L-Arg and INDO as novel drug targets for the treatment of cutaneous leishmaniasis in mouse model.

Keywords: Leishmania major, Nitric Oxide, Indomethacin, L-Arginine

Archive of SID

1- (*Corresponding Author) Researcher, AJA University of Medical Science, Department of Biochemistry, Tehran, Iran
Tel: E-mail: elhamgha_2007@yahoo.com
2- Resercher, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

www.SID.ir