

## ناشی از لیشمانیا ماژور در مدل موشی

دکتر مهدی محبعلی<sup>۱</sup>، پریسا یعقوبی<sup>۲</sup>، دکتر بدخشان هوشمند<sup>۳</sup>، دکتر علی خامسی پور<sup>۴</sup>

۱-استاد، گروه انگل شناسی، ۲- کارشناس ارشد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۳- دامپزشک، اداره مبارزه با بیماریهای واگیر، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ۴- استادیار، مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران

هفته، روزانه دو نوبت تحت درمان موضعی با پماد پارومو- یو قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** میانگین قطر زخم‌های گروه‌های تحت مداخله و شاهد ۱ و ۲ قبل از درمان به ترتیب ۱۰/۹، ۵/۹، ۶ میلی‌متر و پس از درمان ۴، ۱۲/۷، ۱۴/۳ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در گروه تحت مداخله با انجام آزمایش‌های مستقیم و کشت بعد از درمان هیچگونه انگلی دیده نشد، در حالیکه در تمامی موش‌های گروه شاهد اجسام لیشمن مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** پماد Paromo-U در درمان ضایعات پوستی ناشی از L.major در موش مؤثر می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** لیشمانیا ماژور، پماد پاراموایسین (پارومو- یو)، لیشمانیوز جلدی، موش

فصلنامه بیماریهای پوست، زمستان ۱۳۸۲، ۲۶: ۹۴-۸۸

**مقدمه:** با توجه به مشکلات، عوارض جانبی و عدم پاسخ مناسب به داروهای رایج در درمان سالک، لزوم یافتن درمان جایگزین خصوصاً درمانهای موضعی ضروری بنظر می‌رسد.

**هدف:** تعیین میزان اثربخشی پاراموایسین موضعی (پماد Paromo-U) بر روی لیشمانیوز جلدی ناشی از L.major در مدل موشی.

**روش اجرا:** با تلقیح پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در قاعده دم موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی (outbred) و ایجاد ضایعه در آنها بعد از ۱ تا ۳ ماه، موش‌های مورد نظر بطور تصادفی به سه گروه تحت مداخله (درمان با Paromo-U)، و گروه‌های شاهد ۱ و ۲ (درمان با آوره و آب مقطر) تقسیم شده و به مدت ۸

### مقدمه

لیشمانیوز بیماری انگلی است که به اشکال بالینی جلدی، جلدی مخاطی و احشائی در انسان دیده می‌شود. لیشمانیوز جلدی از زمان‌های بسیار دور در ایران وجود داشته و امروزه کشور ما یکی از کانون‌های مهم این بیماری

مؤلف مسئول: دکتر مهدی محبعلی - دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

در جهان محسوب می‌گردد (۱-۳).

در ایران دو شکل ZCL (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis) با عامل L.major و ACL (Anthroponitic Cutaneous Leishmaniasis) وجود دارد. ایران با بالاترین میزان بروز ZCL در شمار کشورهایی است که عفونت با L.major در بعضی از مناطق آن به شکل آندمیک مشاهده می‌گردد (۴).

نبوده و اغلب ضایعات آن خودبخود بهبود می‌یابند. ولی به دلایل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم و نازیبا بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه، ارائه روش درمان آسان، قابل تحمل و همراه با عوارض جانبی ناچیز، ضروری به نظر می‌رسد.

از آنجا که استفاده از روش‌های درمانی رایج از قبیل ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موآن به عنوان داروهای رده اول درمانی بیماری لیشمانیوز دارای عوارض جانبی بسوده و علاوه بر آن با توجه به نیاز به تزریقات مکرر و دردناک، طولانی بودن دوره مصرف، گرانی قیمت، احتمال عود بیماری و اینکه درمان در همه موارد مؤثر واقع نمی‌شود (۲،۵)، لذا یافتن درمانی ساده، موضعی و مناسب و ارزیابی پماد یا کرم‌های موضعی ضروری و منطقی است.

داروی پاراموایسین از گروه آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید می‌باشد که از گونه استرپتومایسین ریموسوس به دست می‌آید. این دارو سبب اختلال سنتز پروتئین در میکروارگانیسم می‌شود (۶) و علاوه بر اثر ضدانگلی آن (لیشمانیوز، آمیبیاز داخل روده‌ای و آلودگی به سستودها) بر روی باکتری‌ها نیز (بعضی باسیل‌های گرم منفی) مؤثر می‌باشد (۶۸).

در این زمینه مطالعات و بررسی‌هایی بر روی پماد پاراموایسین به تنهایی و یا همراه با ترکیبات دیگر در درمان لیشمانیوز جلدی در کشورهای مختلف انجام گرفته که نتایج مثبتی را به همراه داشته است (۹-۱۲). پاراموایسین همراه با ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موآن سبب تأثیر بیشتر داروهای فوق در درمان لیشمانیوز می‌گردد.

هدف از اجرای این مطالعه بررسی اثر پماد پاراموایسین در لیشمانیوز در مدل موشی و امکان معرفی آن به عنوان روش درمانی مناسب همراه با عوارض جانبی کمتر و قابل تحمل برای بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی

## روش اجرا

این مطالعه از نوع مداخله‌ای و به روش تجربی و به شکل باز (open) بر روی موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی در آزمایشگاه لیشمانیوز، حیوانخانه دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است.

مراحل کار به شرح زیر بود:

۱- کشت انگل لیشمانیا ماژور:

ابتدا از زخم آلوده به *L. major* ایزوله اصفهان (MRHO-IR/75/ER) نمونه برداری شد. پس از تهیه گسترش نازکی از آن و رنگ آمیزی با گیمسا و مشاهده مستقیم آماستیگوت‌ها، مقداری از ترشحات ضایعه برداشت شده و در محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاو تحت شرایط آسپتیک کشت داده شد. پس از ۵ روز، از پروماستیگوت‌های حاصله که در فاز ایستای رشد بودند برداشت شده و با استفاده از لام ثوبار تعداد آنها شمارش گردید. در این مرحله تعداد پروماستیگوت‌ها  $10 \times 25$  در هر میلی لیتر تثبیت گردید.

۲- آماده سازی حیوان آزمایشگاهی جهت تیمار:

در این بررسی از موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی (outbred - سوری) از هر دو جنس که جداگانه نگهداری می‌شدند و از نظر سنی ۶ الی ۸ هفته‌ای بودند استفاده شد.

به منظور ایجاد ضایعه در موش‌ها، از اشکال پروماستیگوت لیشمانیا در فاز ایستای رشد استفاده گردید. برای این منظور چند روز متوالی، انگل‌های کشت شده در محیط RPMI شمارش شدند و پس از حصول اطمینان از فاز ایستا به تعداد  $10 \times 2/5$  انگل در هر تزریق (۱/۰ میلی‌متر) به شکل زیر جلدی در محل انتهای دم حیوان تزریق گردید. پس از گذشت ۱ تا ۳ ماه در محل تزریق

### یافته ها

از مجموع ۶۰ قطعه موش تلقیح شده با لیشمانیا مازور،

تعداد ۲۷ قطعه واجد شرایط لازم جهت مطالعه و

نتیجه گیری بوده اند. نتایج حاصله از تعداد ۲۷ قطعه موش

مبتلا به لیشمانیوز جلدی که به سه گروه تحت مداخله و

شاهد های ۱ و ۲ تقسیم شدند به شرح زیر بوده است:

۱- در اندازه گیری های انجام شده قطر زخم های گروه

تحت مداخله پس از گذشت ۸ هفته از درمان کاهش قابل

ملاحظه ای (۶۲/۷۷ درصد) داشته، در حالیکه در گروه های

شاهد ۱ و ۲ قطر زخم ها افزایش (۱۱۳/۱۳ و ۱۳۶/۸۵

درصد) یافته است ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱).

۲- در آزمایش میکروسکوپی از ترشحات ضایعات

موش های تحت مداخله، آماستیگوت مشاهده نگردید، در

صورتیکه در کلیه موش های گروه های شاهد انگل دیده

شد (جدول شماره ۲).

۳- در کشت ترشحات ضایعات گروه تحت مداخله،

پروماستیگوت دیده نشد در صورتیکه در کشت به عمل

آمده در گروه های شاهد ۱ و ۲، انگل مشاهده

گردید (جدول شماره ۲).

لازم به ذکر است در طی استفاده از پماد پارامو-یو، در

تمامی موش های تحت مداخله موهای اطراف ضایعه شروع

به ریزش کرده و التهاب و قرمزی در آن ناحیه ایجاد

می گردید که پس از اتمام درمان، بتدریج آثار فوق برطرف

شدند.

در پیگیری های پس از درمان پس از گذشت ۳ ماه،

هیچ موردی از عود بیماری دیده نشد.

جدول شماره ۱ - توزیع اندازه قطر زخم‌های لیثمانیوز جلدی قبل و پس از درمان با پماد پارومو- یو در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی و مقایسه آنها با جمعیت‌های شاهد

پس از درمان X ±SD		قبل از درمان X ±SD	قطر زخم (میلی‌متر) گروه‌های درمانی (n=۹)
هفته ۸	هفته ۴		
۴/۰۵ ± ۲/۸۲	۷/۳۸ ± ۲/۴۲	۱۰/۸۸ ± ۳/۲۴	پماد پارومو- یو
۱۲/۶۶ ± ۶/۴۰	۹/۰۵ ± ۵/۴۲	۵/۹۴ ± ۴/۴۳	اوره
۱۴/۳۳ ± ۷/۸۷	۱۰/۶۱ ± ۶/۲۸	۶/۰۵ ± ۳/۹۵	آب مقطر

جدول شماره ۲ - نتایج انگل‌شناسی زخم‌های ناشی از لیثمانیوز جلدی قبل و پس از درمان با پماد پارومو- یو در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی و مقایسه آنها با جمعیت‌های شاهد

۸ هفته پس از درمان		۴ هفته پس از درمان		قبل از درمان		نتایج انگل‌شناسی گروه‌های درمانی
کشت	روش مستقیم	کشت	روش مستقیم	کشت	روش مستقیم	
-	-	-	-	+	+	پماد پارومو- یو
+	+	+	+	+	+	اوره
+	+	+	+	+	+	آب مقطر

## بحث

طبق نتایج بعضی از مطالعات، ترکیب فوق دارای توکسیسته موضعی بوده و در بعضی از بیماران تحمل نمی‌شود (۱۸). دو نوع ترکیب آمونیوم و سولفات پاراموایسین در مدل‌های تجربی و کارآزمایی‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهند که ترکیب سولفات پاراموایسین غیر سمی‌تر و مؤثرتر از آمونیوم پاراموایسین بوده است (۱۹). در مطالعه‌ای که بر روی انسان انجام شده استفاده از پماد محتوی پاراموایسین ۱۵ درصد و متیل بنزاتونیوم کلراید ۱۲ درصد روزی دو بار به مدت ۲۰ روز دارای اولین پاسخ درمانی ۹۱/۴ درصد و پاسخ درمان نهایی ۸۵/۷ درصد بوده است (به ترتیب ۱۳ هفته و ۱۲ ماه پس از درمان). در

یکی از ترکیباتی که در درمان بیماری لیثمانیوز به تنهایی و یا همراه با سایر داروهای اختصاصی به کار گرفته شده است، داروی پاراموایسین (از گروه آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید) می‌باشد که در سالهای اخیر اثر ضد لیثمانیایی آن بر روی گونه‌های مختلف لیثمانیا در مطالعات تجربی و بالینی به اثبات رسیده است (۱۵-۱۳). پماد پاراموایسین ۱۵ درصد به همراه ۱۲ درصد متیل بنزاتونیوم کلراید در پارافین سفید دارای اثر درمانی مطلوب بر روی لیثمانیا مازوردر موش‌های آزمایشگاهی بوده (۱۶) و در کارآزمایی‌های بالینی متعدد بر روی لیثمانیا مازور، لیثمانیا تروپیکا و لیثمانیا اتیوپیکا مؤثر بوده است (۱۷). البته

مطالعه دیگری بر روی موشهای balb/c که توسط پارامومایسین ۱۵ درصد و جنتامایسین ۰/۵ درصد روزی دو بار به مدت ۱۰ روز انجام گرفت، ۱۰۰ درصد ضایعات ناشی از L.major از بیست روز بعد از درمان بهبودی یافته و تا روز ۷۰ نیز عود نداشتند (۲۱، ۲۰). همچنین در مطالعه‌ای در ایران، درمان افراد با پماد پارامومایسین دوبار در روز به مدت ۴ هفته، نتایج بهتری (بهبود بالینی ۲/۳ افراد) را در مقایسه با دو هفته نشان داده است (۱۲، ۱۱). از آنجائیکه استفاده از ترکیب اوره ۱۰ درصد میزان نفوذ پذیری دارو را در موضع افزایش داده و توکسیسته آن نیز در مقابل متیل بنزاتونیوم کلراید بسیار ناچیز است، لذا همراه با پارامومایسین سولفات ۱۵ درصد به همراه اوره ۱۰ درصد که اخیراً توسط شرکت داروسازی رازک تهیه شده جهت تعیین اثر درمانی آنها بر روی لیشمانیوز جلدی در مدل تجربی استفاده گردیده است. جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که پماد مذکور باعث کاهش معنی‌دار اندازه زخم‌های لیشمانیوز جلدی در حیوانات تحت درمان با پماد پارومو-یو به میزان ۶۲/۷۷ درصد شد، در حالیکه در جمعیت‌های شاهد افزایش قابل توجه اندازه زخم‌های به میزان ۱۱۳/۱۳ و ۱۳۶/۸۵ درصد مشاهده گردید. اصولاً داروی مطلوب جهت درمان لیشمانیوز جلدی بایستی علاوه بر کاهش اندازه زخم، محو کامل اجسام لیژمن را نیز به همراه داشته باشد. زیرا انگل‌های باقیمانده در ضایعات قادر به تکثیر بوده و عود بیماری را به همراه خواهند داشت. چنانچه در جدول شماره ۲ مشاهده می‌گردد پماد پارومو-یو باعث محو کامل انگل‌های لیشمانیا ۴ تا ۸ هفته پس از درمان

شده، در حالیکه انگل‌های لیشمانیا در جمعیت‌های گروه‌های شاهد، وجود داشته و در حال تکثیر بوده‌اند. این نتایج با مطالعات انجام شده قبلی نیز همخوانی داشته است (۱۹، ۱۲، ۱۱).

از آنجائیکه اندازه ضایعات جلدی، ۸ هفته پس از درمان در مقایسه با ۴ هفته پس از درمان، کاهش معنی‌داری را نشان داده و همچنین جهت جلوگیری از عود بیماری، به نظر می‌رسد ادامه درمان تا مدت ۸ هفته از اطمینان بیشتری برخوردار باشد.

علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داده که پماد پارامومایسین تا حدودی باعث تحریکات موضعی شده و بر اساس خاصیت lytic دارو در روزهای اولیه پس از درمان، حتی ممکن است باعث افزایش قطر زخم‌ها شود ولی به مرور زمان این عوارض برطرف شده و باعث کاهش اندازه زخم و از بین رفتن انگل‌های لیشمانیای درون آن می‌گردد. نتیجه‌گیری نهایی این مطالعه آن است که پمادهای پارومو-یو تهیه شده در ایران براساس پروتکل درمانی (روزی دو مرتبه به مدت ۸ هفته) دارای اثر ضدلیشمانیایی موضعی بوده و قادر به بهبود ضایعات جلدی ناشی از لیشمانیا مازور در مدل حیوانی می‌باشد.

### تشکر و قدر دانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از خانمها هما حجاران، بهناز آخوندی و سرور چاره دار و آقای محمدتقی سطوت به جهت همکاری در کارهای آزمایشگاهی ابراز می‌نمایند.

- 1-Leishmania and HIV in gridlock. WHO/CTD/Leish/98/9/Add 1.
- 2-Kenner R. Leishmaniansis. Med J 2001. 11.
- ۳-صائبی ا. بیماریهای انگلی در ایران (بیماریهای تک یاخته‌ای). تهران: موسسه فرهنگی انتشاراتی حیان. ۱۳۷۷: ۶۵-۱۶۶.
- ۴-ندیم ا. اپیدمیولوژی لیشمانیوز در ایران: عزیزی ف و همکاران (مؤلفین). اپیدمیولوژی بیماریهای شایع در ایران. تهران: انتشارات مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، سال ۱۳۸۱.
- 5-Technical report. Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO expert committee, 1990; 793: 50-54.
- 6-Robert S, Gold S. Antiprotozoal drugs. In: Bertram G (ed). Katzung basic and clinical pharmacology. Appleton & Lange, 1992: 741.
- 7-Robert S, Gold S. Clinical pharmacology of the anthelmintic drugs. In: Bertram G. Katzung basic & clinical pharmacology. Appleton & Lange, 1992: 758.
- 8-Ernest J. Aminoglycoside & polymyxins. In: Bertram G (ed). Katzung basic & clinical pharmacology. Appleton & Lange, 1992: 645.
- 9-El-on J, Halevy S, Grunwals MH, et al. Topical treatment of old world cutaneous leishmaniasis caused by leishmania major: a double-blind control study. J Am Acad Dermatol 1992; 27: 227-31.
- 10-El-on J, Hamburger AD. Topical treatment of new and old world cutaneous leishmaniasis in experimental animals. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81: 734-37.
- 11-Asilian A, Jalayer T, Whitworth JAG, et al. A randomized, placebo, controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. Am J Trop Med Hyg 1995; 53: 648-51.
- 12-Asilian A, Jalayer T, Nilforooshzadeh M, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. Bulletin of the World Health Organization 2003; 81: 353-59.
- 13-Neal RA. Experimental chemotherapy. In: Peters W, Killick-Kendrick R, (eds). The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press, 1987: 793-845.
- 14-Bryceson ADM, Murphy A, Moody AH. Treatment of old world cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: results of an open study in London. Trans R Soc Med Myg 1994; 88: 226-28.
- 15-Thakur CP, Olliaro P, Gothoskar S, et al. Treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar) with aminosidine (Paromomycin), antimonial combinations, a pilot study in

- Bihar, India. R Soc Trop Med Hyg 1992; 86: 615-16.
- 16-El-on J, Jacobs G, Witzum E, et al. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by leishmania major in experimental animals. Antimicrobial agents and chemotherapy 1984; 26: 745-51.
- 17-El-on J, Jacobs GP, Weinrauch L. Topical chemotherapy of cutaneous leishmaniasis. Parasitol Today 1988; 4: 76-81.
- 18-Bryceson ADM. Therapy in man. In: Peters W, Killick-kendrick R (eds). The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press 1987: 847-907.
- 19-Neal RA, Murphy A, Olliaro P, et al. Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2994; 88: 223-25.
- 20-Arana BA, Mendoza CE, Rizzo NR, et al. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride in Guatemals. Am J Trop Med Hyg 2001, 65: 466-70.
- 21-Grogl M, Schuster BG, Ellis WY, et al. Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and Gentamicin. J Parasitol 1999; 85: 354-59.