

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

ماندانا بخشی زاده^۱، دکتر سیدحسین 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 لیثمانیایی در حیوان و انسان نقش به سزایی دارد. در این تحقیق اثر درمانی ترکیب‌هایی که در پایه کرم قادر به آزاد کردن نیتریک اکساید هستند بر ضایعه‌های جلدی ناشی از لیثمانیا ماژور در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش اجرا: موش‌های خالص نژاد Balb/c با تزریق زیرجلدی انگل لیثمانیا، 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 لیثمانیوز مؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی: لیثمانیوز، درمان، نیتریک اکساید

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

اعلام قبلی: ۱۳۹۱/۵

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۲۰

مقدمه
لیثمانیوز، بیماری ناشی از نوعی تک‌یاخته انگلی متعلق به جنس لیثمانیا است که گروه بزرگی از ارگانسیم‌ها را تشکیل می‌دهند و در چرخه تکاملی خود میزبان‌های مهره‌دار و بی‌مهره را در بیشتر نقاط دنیا آلوده می‌کنند (۱). بیماری در انسان به سه شکل اصلی دیده می‌شود: لیثمانیوز پوستی (سالک)، لیثمانیوز پوستی مخاطی (اسپوندیا) و لیثمانیوز احشایی (کالا آزار) (۲).

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

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 اخیر 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.

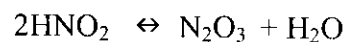
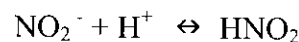
یافته‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه

(ANOVA) و دانکن (Duncan) با قبول مرز معنی‌داری

$P < 0.05$ تحلیل شد.

نیتریک اکسید (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 الفاکننده‌ی 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 نیترات 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 دی‌نیترژن 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 نیتريت 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،

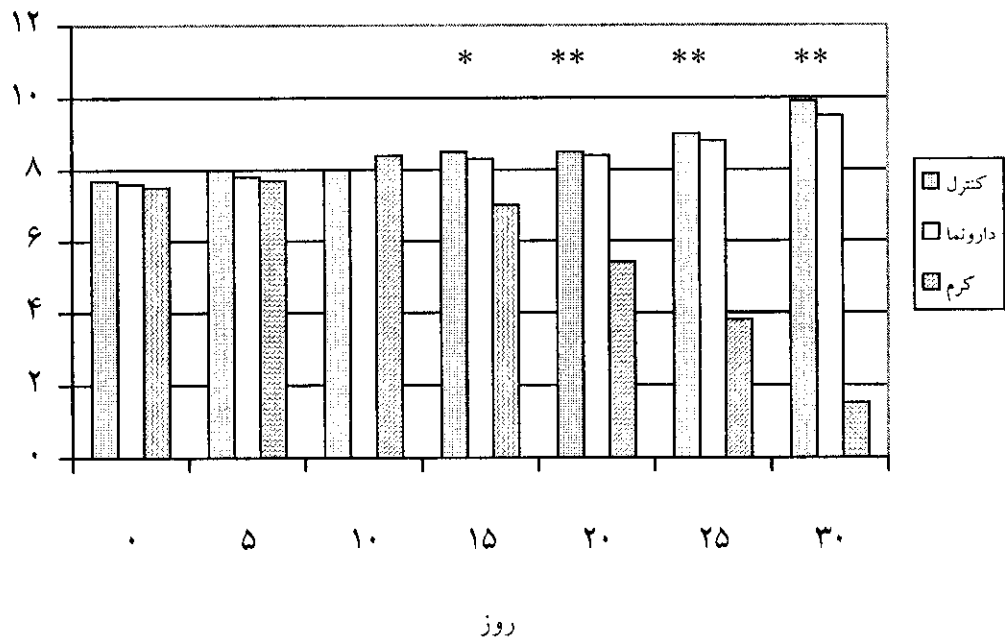
بثورات جلدی و تغییرات موج الکتروکاردیوگرام تلاش

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).

میانگین ± انحراف معیار اندازه زخم



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 پتاسیم، دارونما و گروه کنترل.
 $P < 0.05$ ، * $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل

بحث

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که درمان سی‌روزه با کرم ترکیبی نیترات-اسید استیک (باغلظت ۲٪) توانایی کنترل پیش رفت زخم‌ها را دارا بوده و دارای اثر رضایت بخش 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

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 پنج‌ظرفیتی آنتی‌موان است که با اسامی تجارتي گلوکانتیم و پنتوستام عرضه می‌شود ولی به دلیل عوارض جانبی، تلاش برای دستیابی به

داروهایی با سرعت عمل بیش‌تر و عوارض کم‌تر ادامه دارد (۱۰-۱۲). کرم ترکیبی نیتريت پتاسيم با اسيد استيک آزادکننده‌ی خارجی نیتريک اکسید است و نیتريک 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، نیتريک 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 پتاسيم با کلريد پتاسيم (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 فوق‌نظیر داروی فوق مؤثر است و موجب بهبودی زخم می‌شود (۹). همین محقق مطالعه مشابهی با کرم ترکیبی اسید اسکوریک با نیتريت پتاسيم (غلظت ۰/۰۲) و کرم ترکیبی نیتريت پتاسيم 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 پاراموایسین سولفات ۵ درصد و اینترکولین-۱۲ نوترکیب (rIL-12) به‌طور 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

این مدت درمانی به‌طور کامل التیام یافتند و ۱۲۰ روز بعد از درمان عودی از زخم دیده نشد. در گروهی که با پاراموایسین 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، به‌عنوان 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 پاراموایسین 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 به‌صورت جنتامایسین، پاراموایسین و پاراموایسین 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 پاراموایسین 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

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.