

اثر پماد پارامومایسین تهیه شده در ایران (پارومو-یو) بر لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیا مازور در مدل موشی

دکتر مهدی محبعلی^۱، پریسا یعقوبی^۲، دکتر بدخشنان هوشمند^۳، دکتر علی خامسی پور^۴

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 ۶، ۰/۹، ۱۰/۹ و ۶ میلیمتر و پس از درمان ۴، ۱۲/۷، ۱۴/۳ میلیمتر اندازه گیری 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 لیشمون مشاهده گردید.

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

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا مازور، پماد پارامومایسین (پارومو-یو)، لیشمانیوز جلدی، موش

فصلنامه بیماریهای پوست، زمستان ۱۳۹۲/۰۶-۰۷

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 پارامومایسین موضعی (پماد U-Paromo) بر روی لیشمانیوز جلدی ناشی از L.major در مدل موشی.

روش اجرا: با تلقیح پرماستیگوت‌های لیشمانیا مازور 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 U-Paromo)، و گروههای شاهد ۱ و ۲ (درمان با اوره و آب مقطر) تقسیم شده و به مدت ۸

در جهان محسوب می‌گردد^(۱-۳).

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

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 انتیتو تحقیقات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

بود.

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 انسیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است.

مراحل کار به شرح زیر بود:

۱- کشت انگل لیشمانیا ماذور:

ابتدا از زخم آلوده به L.major ایزو له اصفهان (MRHO-IR/75/ER) نمونه برداری شد. پس از تهیه گسترش نازکی از آن و رنگ آمیزی با گیمسا و مشاهده مستقیم آماتیگوت‌ها، مقداری از ترشحات ضایعه برداشت شده و در محیط کشت 1640 RPMI 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 تنویار تعداد آنها شمارش گردید. در این مرحله تعداد پروماستیگوت‌ها 10×25 در هر میلی لیتر ثبت 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 (۱۱ میلیمتر) به شکل زیر جلدی در محل انتهای دم حیوان تزریق گردید. پس از گذشت ۱ تا ۳ ماه در محل تزریق

سالک در مقایسه با سایر بیماریها چندان مشکل آفرین نبوده و اغلب ضایعات آن خودبخود بهبود می‌باشد. ولی به دلایل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم و نازیبا بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه، ازانه 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 آنتموآن به عنوان داروهای رده اول درمانی بیماری لیشمانیوز دارای عوارض جانبی بوده 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 پارامومایسین از گروه آنتی بیوتیک‌های آمینو گلیکوزید می‌باشد که از گونه استرپتومایسین ریموسوس به دست می‌آید. این دارو سبب اختلال سترز پروتئین در میکرووارگانیسم می‌شود (۶) و علاوه بر اثر ضدانگلی آن (لیشمانیوز، آمیباز داخل روده‌ای و آلودگی به سیستودها) بر روی باکتری‌ها نیز (بعضی باسیل‌های گرم منفی) مؤثر می‌باشد (۷).

در این زمینه مطالعات و بررسی‌هایی بر روی پماد پارامومایسین به تنها بی 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). پارامومایسین همراه با ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موآن سبب تأثیر بیشتر داروهای فوق در درمان لیشمانیوز می‌گردد.

هدف از اجرای این مطالعه بررسی اثر پماد پارامومایسین 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

روش‌های آماری ANOVA و Paired Test نتیجه‌گیری گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۶۰ قطعه موش تلقیح شده با لیشمانیا مازور، تعداد ۲۷ قطعه واحد شرایط لازم جهت مطالعه و نتیجه‌گیری بوده‌اند. نتایج حاصله از تعداد ۲۷ قطعه موش مبتلا به لیشمانیوز جلدی که به سه گروه تحت مداخله و شاهدهای ۱ و ۲ تقسیم شدند به شرح زیر بوده است:

۱- در اندازه گیری‌های انجام شده قطر زخم‌های گروه تحت مداخله پس از گذشت ۸ هفته از درمان کاهش قابل ملاحظه‌ای (۶۲/۷۷ درصد) داشته، در حالیکه در گروههای شاهد ۱ و ۲ قطر زخم‌ها افزایش (۱۱۳/۱۳ و ۱۳۶/۸۵ درصد) یافته است (P<0.05) (جدول شماره ۱).

۲- در آزمایش میکروسکوپی از ترشحات ضایعات موش‌های تحت مداخله، آماتیکوت مشاهده نگردید، در صورتیکه در کلیه موش‌های گروههای شاهد انگل دیده شد (جدول شماره ۲).

۳- در کشت ترشحات ضایعات گروه تحت مداخله، بروماستیکوت دیده نشد در صورتیکه در کشت به عمل آمده در گروههای شاهد ۱ و ۲، انگل مشاهده گردید (جدول شماره ۲).

لازم به ذکر است در طی استفاده از پماد پارامو-یو، در تمامی مشاهدات تحت مداخله موهای اطراف ضایعه شروع به ریزش کرده و التهاب و قرمزی در آن ناحیه ایجاد می‌گردید که پس از اتمام درمان، بتدریج آثار فوق برطرف شدند.

در پیگیری‌های پس از درمان پس از گذشت ۳ ماه، هیچ موردی از عود بیماری دیده نشد.

ابتدا پاپول و سپس ندول و زخم ایجاد شد. قبل از شروع درمان جهت اطمینان از اینکه این ضایعات مربوط به عفونت لیشمانیایی بوده است، از ضایعات نمونه برداری شد و با مشاهده مستقیم اجسام لیشمانتیز جلدی در این حیوانات تایید گردید. در این بررسی موش‌های مورد نظر به شکل تصادفی به سه گروه زیر تقسیم شدند:

گروه تحت مداخله: ۹ قطعه موش شماره گذاری شده و با پماد پارامومایسین حاوی ۱۵ درصد سولفات پارامومایسین و ۱۰ درصد اوره (با نام تجاری پارومو-یو ساخت شرکت داروسازی رازک)، روزانه دو مرتبه به مدت ۸ هفته تحت درمان قرار گرفتند. این پمادها توسط اداره زنوبنوزهای مرکز مدیریت بیماریهای وزارت بهداشت در اختیار ما قرار گرفت.

گروه شاهد ۱: ۹ قطعه موش با محلول اوره ۱۰ درصد روزی دوبار و به مدت ۸ هفته تحت درمان قرار گرفتند. گروه شاهد ۲: ۹ قطعه موش بوسیله آب مقطر روزی دو مرتبه و به مدت ۸ هفته تحت درمان قرار گرفتند.

۳- ارزیابی درمان: به منظور ارزیابی نتایج درمانی در موش‌ها، پس از پایان دوره درمانی و در صورت ابتلای زخم، اقطار زخم بوسیله کولیس اندازه گیری گردید (این کار قبل از درمان و نیز از ابتداء تا پایان درمان هفت‌های یک بار انجام می‌گرفت). از هر یک از زخمها جهت رؤیت جسم لیشمانتیز جلدی، گسترشی تهیه شد و پس از فیکساسیون با متانول و رنگ آمیزی با گیمسا، با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی (۱۰۰۰×) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از ترشحات ضایعات جلدی ایجاد شده در محیط RPMI کشت داده شد. نتایج حاصله با هر یک از گروههای شاهد و موارد مشابه قبل از دوره درمانی مقایسه شده و با استفاده از

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

پس از درمان $X \pm SD$		قبل از درمان $X \pm SD$	قطر زخم (میلیمتر)	گروههای درمانی (n=۹)
۸ هفته	۴ هفته			(n=۹)
۴/۰۵ ± ۲/۸۲	۷/۳۸ ± ۲/۴۲	۱۰/۸۸ ± ۳/۲۴		پماد پارومو- یو
۱۲/۶۶ ± ۶/۴۰	۹/۰۰ ± ۵/۴۲	۵/۹۴ ± ۴/۴۳		اوره
۱۴/۳۳ ± ۷/۸۷	۱۰/۶۱ ± ۶/۲۸	۶/۰۰ ± ۳/۹۵		آب مقطر

جدول شماره ۲ - نتایج انگل شناسی زخم‌های ناشی از لیشمانیوز 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 انگل شناسی		گروههای درمانی
کشت	روش مستقیم	کشت	روش مستقیم	کشت	روش مستقیم	+	+	
-	-	-	-	+	+			پماد پارومو- یو
+	+	+	+	+	+			اوره
+	+	+	+	+	+			آب مقطر

طبق نتایج بعضی از مطالعات، ترکیب فوق دارای توکسیستیه موضعی بوده و در بعضی از بیماران تحمل نمی‌شود(۱۸). دو نوع ترکیب آمونیوم و سولفات پارامومایسین در مدل‌های تجربی و کارآزمایی‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهند که ترکیب سولفات پارامومایسین غیر سمی تر و مؤثرتر از آمونیوم پارامومایسین بوده است(۱۹). در مطالعه‌ای که بر روی انسان انجام شده استفاده از پماد محتوی پارامومایسین ۱۵ درصد و متیل بنزاتونیوم کلرايد 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

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

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 (۱۱، ۱۲، ۱۹).

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 مروز زمان این عوارض برطرف شده و باعث کاهش اندازه زخم و از بین رفتن انگل‌های لیشمانیایی درون آن می‌گردد. نتیجه گیری نهایی این مطالعه آن است که پمادهای پارومو-یو تهیه شده در ایران براساس پروتکل درمانی (روزی دو مرتبه به مدت ۸ هفتگی) دارای اثر ضدلیشمانیایی موضعی بوده و قادر به بهبود ضایعات جلدی ناشی از لیشمانیا مأذور در مدل حیوانی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

مطالعه دیگری بر روی موشهای *c* balb 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 (۲۰، ۲۱). 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 (۱۱، ۱۲). 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 ۶۷/۷۷ 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 لیشمین را نیز به همراه داشته باشد. زیرا انگل‌های باقیمانده در ضایعات قادر به تکثیر بوده و عود بیماری را به همراه خواهد داشت. چنانچه در جدول شماره ۲ مشاهده می‌گردد پماد پارومو-یو باعث محو کامل انگل‌های لیشمانیا ۴ تا ۸ هفته پس از درمان

منابع

- 1-Leishmania and HIV in gridlock. WHO/CTD/Leish/98/9/Add 1.
- 2-Kenner R. Leishmaniasis. Med J 2001; 11.
- ۳- صائبی ا. بیماریهای انگلی در ایران (بیماریهای تک یا مختلط). تهران: موسسه فرهنگی انتشاراتی حیان. ۱۳۷۷: ۱۶۴-۶۵.
- ۴- ندیم ا. آپیدمیولوژی لیشمینیوز در ایران: عزیزی ف و همکاران (مؤلفین). آپیدمیولوژی 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, Olliari 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 1994; 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.