اثر مورفین بر لیشمانیوز جلدی در موش BALB/C

رویا علوی نایینی[۱]، اصغر فضائلی*[۱،۲]، بشیر محمد پژمان[۳]، حسین انصاری[۴]، بهمن فولادی[۵]، علی خامسی پور[۶]

۱. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۲. متخصص انگل شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳. دستیارتخصصی بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۴. فوق لیسانس آمار، مربی هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۵. فوق لیسانس انگل شناسی، مربی هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی زابل
۶. متخصص میکروبیولوژی، دانشیار مرکز آموزشی و پژوهشی بیماریهای پوست و جذام تهران

نشانی برای مکاتبه: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی،کد پستی: ۴۵۱۳۹۵۶۱۱۱، تلفن: ۳-۴۲۴۰۳۰۱- ۰۲۴۱، نمابر ۴۲۴۹۵۵۳ ، fazaeli@zums.ac.ir و afparm1@yahoo.co.uk

دریافت مقاله: خرداد هشتاد و هشت پذیرش برای چاپ: شهریور هشتاد و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *لیشمانیوز جلدی بیماری عفونی است که ضایعات مزمن ایجاد می کند و درمان کاملا مطلوبی ندارد. استفاده از درمان موضعی به سبب سمیت کمتر، حائز اهمیت است. اثر ایمونومودولاتوری مورفین از سالها قبل شناخته شده و شواهد زیادی نشان می دهد اپیوییدها بعنوان اعضاء خانواده سایتوکین‌ها، تنظیم کننده سیستم ایمنی و پاسخ التهابی می باشند. هدف از این مطالعه، تعیین اثر مورفین بعنوان یک ایمونومودولاتور در فرایند بهبود لیشمانیوز جلدی در موش های BALB/C است.*

روش کار: *۴۰ سر موش BALB/C به پنج گروه ۸ تایی (A, B, C, D, E) تقسیم و به هر یک از آنها تعداد $۲/۵ \times ۱۰^{۶}$ پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در ناحیه قاعده دم تزریق زیرجلدی گردید. گروه A و B بترتیب بعد از هفته اول و پنجم تلقیح تحت درمان مورفین موضعی قرار گرفتند، به همان ترتیب گروه C و D تحت درمان با مورفین داخل صفاقی قرار گرفتند و گروه E (گروه کنترل) هیچ درمانی دریافت نکردند. سپس قطر ضایعات پوستی هفته ای یک بار بوسیله Vernier-caliper اندازه گیری شد.*

یافته ها: *اندازه ضایعات پوستی در همه موش های BALB/C دریافت کننده مورفین و گروه کنترل افزایش نشان داد. قطر متوسط ضایعات در هفته پنجم اندازه گیری ، به وضوح بزرگتر از هفته اول بود. متوسط اندازه ضایعات بین گروه های موش های دریافت کننده مورفین در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان نداد.*

نتیجه‌گیری: *استفاده مورفین موضعی و داخل صفاقی هیچکدام تاثیری در بهبود ضایعات ناشی از لیشمانیا ماژور در موش های BALB/C نداشت. مطالعات دیگری با دوزهای دیگر مورفین و استفاده از موش های سایر سوش ها غیر از BALB/C مثل موش های سفید سوری و هامستر ممکن است نتایج متفاوتی بدست دهد.*

واژگان کلیدی: ***لیشمانیا ماژور, مورفین, سالک, BALB/ C***

مقدمه

لیشمانیوز جلدی جزء شش بیماری گرمسیری مهمی است که سازمان جهانی بهداشت WHO بر آن تاکید دارد و در ۹۰ کشور گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان دیده می شود. بیش از ۲۰ گونه مختلف لیشمانیا باعث تظاهرات مختلف بالینی بصورت جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی می شود که تظاهرات جلدی شایعترین شکل بالینی آن است. لشمانیوز پوستی یک مسئله مهم بهداشتی در مناطق اندمیک است و ۹۰ درصد آن در کشورهای ایران، عربستان، سوریه، افغانستان، برزیل و پرو دیده می شود(۴-۱) . حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به لیشمانیوز در جهان هستند که از این میان ۱۲ میلیون نفر در حال حاضر از این بیماری رنج می برند((۳و۴). انتشار لیشمانیوز جلدی نوع روستایی در ۱۱ استان ایران گزارش گردیده است و کانون های جدیدی در مناطق مختلف کشور اخیرا کشف شده است. عامل این نوع لیشمانیوز، لیشمانیا ماژور است که غالبا توسط فلبوتوموس پاپاتاسی منتقل می شود. از کانونهای مهم آن می توان به مناطقی در استان های اصفهان، خوزستان، گلستان، خراسان وکانون های جدیدا مطالعه شده از جمله کانون مرزی میرجاوه در استان سیستان و بلوچستان اشاره کرد (۵)، اگرچه علاوه بر کانون میرجاوه در شرق استان، منطقه اندمیک دیگری نیز در جنوب استان در محدوده چابهار، کنارک و دشتیاری از گذشته نه چندان دور وجود داشته است(۲و۵). در کشورهای همسایه ایران (پاکستان و افغانستان) نیز مناطق اندمیک و کانونهایی از هر دو نوع سالک خشک ومرطوب وجود دارد(۱) که ممکن است منشأ اولیه آلودگی در این مناطق مرزی باشد.

سمیت زیاد ترکیبات آنتی موان، تجویز تزریقی، مصرف طولانی مدت، مقاومت دارویی و قیمت بالای آنها باعث شده است که تحقیقات زیادی در مورد داروهای جایگزین انجام شود. از داروهای سیستمیک می توان فلوکونازول، کتوکونازول، Miltefosine ، آمفوتریسین B , پنتامیدین، ایمونوتراپی با BCG وGM-CSF را نام برد و ازداروهای موضعی نیز می توان به پارومایسین، Imiquimod، ترکیب آمفوتریسین B با کلستیرامین در ۱۰٪ اتانول، Sitamaquin dihydrochloride و Trypan اشاره کرد که از بین آنها آمفوتریسین B یک جایگزین موثر برای ترکیبات آنتی موان بوده ولی متاسفانه سمیت بالایی داشته و گران قیمت است (۱۳-۶).

مورفین دارای اثرات متنوعی بر قسمت های مختلف بدن است و به همین دلیل در پزشکی به صورت گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد. مطالعات مختلف آزمایشگاهی و بالینی طیف وسیعی از اثرات مورفین شامل اثر ضد التهابی، آنتی فیبروتیک، آنتی تومور و محافظت کننده قلب و کلیه را نشان داده است از مهمترین آنها، اثر ایمونومودولاتوری (Immunomodulatory effect) است که این اثر در مورد عفونت های باکتریال به خوبی شناخته شده و در مورد لیشمانیوز احشایی نیز در چند مطالعه دیده شده است (۱۹-۱۴). درمطالعه Singal و همکاران، اگرچه تجویز داخل صفاقی دوز بالای مورفین در موش باعث تشدید عفونت لیشمانیوز احشایی (حاصل از لیشمانیا دونووانی) گردید اما دوز پایین این دارو باعث سرکوب عفونت شد و در روز سی ام درمان عفونت انگلی کاملا ریشه کن گردید(۲۰).در خصوص تأثیر مورفین بر لیشمانیوز جلدی مطالعه ای صورت نپذیرفته است. از طرفی در بعضی مناطق ایران که سالک اندمیک است مشاهده گردیده است که از تریاک به صورت موضعی در درمان سالک استفاده کرده و از تأثیر مثبت آن ابراز رضایت می نمایند. با توجه به استقبال بیشتر بیماران از داروهای موضعی وهزینه پایین تر آن این مطالعه با هدف تعیین اثرات مورفین در درمان سالک در مدل حیوانی انجام گرفت.

روش کار

انگل لیشمانیا ماژور، سویه استاندارد MRHO/IR/75/ER، از مرکز تحقیقات پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد و برای کار تحقیقی به مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری زاهدان منتقل گردید. به منظور تکثیرانگل به مقدار کافی، اشکال پروماستیگوت از محیطهای NNN به محیط RPMI-1640 (به تعداد ۲۰ لوله هر کدام حاوی ۵ میلی لیتر) غنی شده با ۱۰٪ FCS، L-glutamine 292µg/ml و دارای ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین پاساژ داده شد. لوله های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتورهای موجود در آزمایشگاه بهداشت محیط مرکز بهداشت استان سیستان و بلوچستان نگهداری می شد. هر دو روز یکبار لوله های کشت مورد بررسی قرار می گرفت. پس از گذشت حداقل یک هفته از پاساژ انگل و زمانی که اشکال پروماستیگوت به مرحله ایستایی (stationary phase) رسیده بودند، محتوای لوله های کشت را سانتریفوژ نموده و انگلهای رسوب داده شده را چند بار با بافر PBS استریل شستشو داده سپس مقداری PBS به آن افزوده و با استفاده از لام نئوبار انگلها در واحد حجم شمارش و محاسبه گردید. در نهایت، PBS به میزانی اضافه گردید که تعداد $۲/۵ \times ۱۰^{۶}$ پروماستیگوت در هر ۱۰۰ میکرولیتر محلول تنظیم گردید. برای انجام این مطالعه، از موش های BALB/C در سنین ۸ تا ۱۰ هفته استفاده گردید. موشها از انستیتو پاستور تهران خریداری و به زاهدان حمل شدند و در بخش نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، در قفسهای مخصوص و در شرایط استاندارد (از نظر نور، دما، غذا و آب) تا پایان طرح نگهداری شدند. همه موشها با انگل لیشمانیا مورد تلقیح قرار گرفتند بطوریکه ناحیه قاعده دم موشها را با اتانول ۷۰٪ ضد عفونی و مقدار ۱۰۰ µl از سوسپانسیون محتوی $۲/۵ \times ۱۰^{۶}$ پروماستیگوت لیشمانیا ماژور به صورت زیرپوستی با سرنگ انسولین به هر یک از آنها تلقیح گردید.

موش های تلقیح شده به ۵ گروه ۸ تایی در قفسهای جداگانه بشرح زیر تقسیم و قفسها شماره گذاری شدند.

گروه اول (A): گروه درمان موضعی مرفین، شروع ۱ هفته پس از تلقیح،
گروه دوم (B): گروه درمان موضعی مرفین، شروع ۵ هفته پس از تلقیح،
گروه سوم (C): گروه درمان تزریقی مرفین، شروع ۱ هفته پس از تلقیح ،
گروه چهار(D): گروه درمان تزریقی مرفین، شروع ۵ هفته پس از تلقیح ،
گروه پنجم (E): گروه کنترل (موشهای تلقیح شده با انگل اما بدون هیچگونه درمان) . در پایان طرح همه موش ها به روش بی دردی معدوم گردیدند.برای تهیه ژل مورفین، ۵mg از مورفین درون ۲/۵ گرم ژل خنثی مخلوط گردید . برای مصرف تزریقی مرفین، دارو در آب مقطر به گونه ای حل گردید که غلظت آن ۳۵ µg /ml تنظیم شد. گروههای مورد آزمایش بشرح زیر مورد درمان قرار گرفتند:

در گروه اول (گروه A) یک هفته پس از تلقیح انگل، ژل مورفین روزی یکبار در محل تلقیح دم موش مالیده شد و تا ۳ هفته درمان بطور روزانه ادامه یافت. در گروه دوم (B) نیز توالی کارها همانند گروه اول بود با این تفاوت که در این گروه، درمان موضعی روزانه از هفته پنجم تلقیح (از زمان ایجاد ضایعات) آغاز گردید.

در گروه سوم (C) یک هفته پس از تلقیح انگل، موش ها تحت تزریق مورفین داخل صفاقی به مقدار mg/kg ۱/۷۵ (۱۰۰ µl معادل کلی µg ۳/۵ به ازای هر موش) قرار گرفتند که هفته‌ای یکبار و به مدت ۳ هفته ادامه یافت. مقدار دوز دارو بر اساس مطالعه Singal و همکاران محاسبه گردید(۲۰). در گروه چهارم (D) پنج هفته پس از تلقیح انگل (پس از پیدایش زخمها) تحت تزریق مورفین داخل صفاقی به مقدار mg/kg ۱/۷۵ (۱۰۰ µl معادل کلی µg ۳/۵ به ازای هر موش) قرار گرفتند که هفته ای یکبار و به مدت ۳ هفته ادامه یافت. گروه پنجم (E) گروه کنترل بودند که بعد از تلقیح انگل به آنها، هیچ اقدام درمانی روی آنها صورت نگرفت و تنها از نظر روند بروز و اندازه ضایعات و مقایسه با سایر گروه ها از نظر نتایج درمانی تا آخر طرح تحت بررسی قرار گرفتند. در ضمن، تعداد ۱۰ سر موش بدون تلقیح انگل در طول دوره مطالعه نگهداری شدند تا در صورت بروز هرگونه ضایعه پوستی یا اشکال دیگر در موشها بدون ارتباط با آلودگی انگلی، مشخص گردد. در تعداد ۵ سر از موشهای سالم نیز تنها ژل خنثی (بدون مرفین) بر روی دم آنها به مدت یک هفته مالیده شد تا ازعدم تأثیر ژل بر ایجاد ضایعه اطمینان حاصل گردد.

از هفته پنجم پس از تلقیح انگل، بعد از ایجاد زخم های سالک در موش ها، اندازه گیری زخم ها به کمک vernier-caliper هفته ای یکبار تا ۵ هفته صورت گرفت و داده ها در دفتر مربوطه ثبت گردید. در هر بار دو قطر متقاطع از ضایعه بوجود آمده اندازه گیری و میانگین آنها بعنوان اندازه زخم محاسبه و ثبت گردید. همچنین در پایان طرح وزن موش ها در تمام گروه ها اندازه گیری و ثبت گردید. جهت اثبات وجود انگل و رشد آن به شکل آماستیگوت (لیشمانیایی) در ضایعات بوجود آمده در قاعده دم موشها، از تعدادی از موشها در همه گروههای آزمایش و کنترل، با خراش دادن کناره زخمها نمونه برداری انجام و پس از تهیه گسترش روی لام و رنگ آمیزی با گیمسا، با استفاده از عدسی ۱۰۰× میکروسکوپ، اشکال آماستیگوت لیشمانیا مورد جستجو قرار گرفت.

پس از تکمیل اندازه گیری زخم های لیشمانیوز جلدی در قاعده دم موش ها در تمام گروه ها (A, B ,C, D, E) طبق روالی که قبلا توضیح داده شد و پس از اندازه گیری وزن کلیه موش ها در اتمام طرح ، برای تجزیه و تحلیل داده ها، از نرم افزار SPSS -15 و آنالیز واریانس فاکتوریال مخلوط ، آزمون توکی و Repeated measurement ANOVA استفاده شد. در تمام موارد حدود اطمینان به صورت ۹۵٪ محاسبه گردید و در تفسیر نتایج مقادیر P. value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بروز ضایعات لیشمانیوز حدود ۵ هفته پس از تلقیح اشکال پروماستیگوت لیشمانیا در قاعده دم موش ها مشاهده گردید و بتدریج در روزها و هفته های بعد اندازه آنها گسترش یافت. گسترش های تهیه شده از ضایعات بوجود آمده در همه گروه ها و مشاهده میکروسکوپی آنها اشکال آماستیگوت لیشمانیا را نشان داد و تأیید نمود که ضایعات همگی در اثر تلقیح انگل بوجود آمده بودند. اندازه زخمها در هر یک از گروه های پنجگانه در جدول ۱ خلاصه شده است.

در گروه A ، میانگین اندازه زخم های لیشمانیوز در هفته اول اندازه گیری زخم ها ۶/۵ سانتیمتر و در هفته پنجم (انتهای طرح) ۱۵/۷۵ سانتیمتر بود. با توجه به آزمون آنالیز واریانس فاکتوریال مخلوط ، بین اندازه زخم در هفته اول و هفته پنجم ، اختلاف معنی داری وجود دارد ($P <$۰/۰۳۴).

در گروه B، میانگین اندازه زخم های لیشمانیوز در هفته اول اندازه گیری ۴/۸۵ سانتیمتر و در هفته پنجم ۱۶/۳۳ سانتیمتر بود. آزمون آنالیز واریانس فاکتوریال مخلوط، اختلاف معنی داری بین اندازه زخم در هفته اول و هفته پنجم نشان داد ($P<$۰/۰۲۵).

در گروه C، میانگین اندازه زخم های لیشمانیوز در هفته اول و پنجم اندازه گیری بترتیب ۵/۳۷ و ۱۵/۱۲ سانتیمتر بود که این اختلاف از نظر آماری معنی داری بود. ($P <$۰/۰۰۱). در گروه D، میانگین اندازه زخم های لیشمانیوز در هفته اول و پنجم بترتیب ۴/۹۱ و ۱۴/۲۱ سانتیمتر بود که اختلاف معنی داری را نشان داد. ($P <$۰/۰۳۱). در گروه E نیز میانگین اندازه زخم های لیشمانیوز در هفته اول و پنجم اندازه گیری بترتیب ۵/۲۵ و ۱۸/۷۵سانتیمتر بود. با توجه به آزمون آنالیز واریانس فاکتوریال مخلوط، بین اندازه زخم در هفته اول و هفته پنجم ، اختلاف معنی داری وجود دارد ($P <$۰/۰۰۱).

در تحلیل آماری بر اساس آزمون Repeated measurement ANOVA بین گروههای مختلف در فواصل زمانی مشابه (هفته های اول ، دوم ، سوم ، چهارم و پنجم) بین اندازه زخم ها اختلاف معنی داری وجود نداشت. همچنین اندازه زخم ها در هیچ یک از گروه های دریافت کننده مورفین با گروه کنترل (E) اختلاف معنی داری نداشتند. بر اساس آزمون فوق وزن موشها در گروه های مختلف اختلاف معنی داری باهم و با گروه کنترل نداشتند. بر اساس آزمون آماری توکی، در کل دوره آزمایشات، اندازه ضایعات در گروه های مختلف با هم اختلاف معنی داری نداشتند و هیچ کدام از گروهها با گروه کنترل نیز اختلاف معنی داری نشان ندادند.

جدول ۱: میانگین اندازه زخم لیشمانیوز جلدی و میانگین وزن در موش های دریافت کننده مورفین و گروه کنترل

گروه موش ها	میانگین قطر زخمها به میلیمتر در نوبتهای مختلف از زمان بروز				میانگین وزن (گرم) در پایان طرح
	هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳	هفته ۴	هفته ۵	
A	۶/۵۰	۸/۸۵	۱۰/۴۲	۱۴/۸۵	۱۵/۷۵	۱۹/۶۷
B	۴/۸۵	۷/۵۷	۹/۱۶	۱۵/۶۶	۱۶/۳۳	۱۷/۸۱
C	۵/۳۷	۶/۵۰	۸/۷۵	۱۲/۸۷	۱۵/۱۲	۱۹/۸۷
D	۴/۹۱	۵/۷۵	۶/۰۰	۱۲/۲۵	۱۴/۲۱	۱۸/۷۱
E	۵/۲۵	۷/۸۷	۹/۸۷	۱۴/۷۵	۱۸/۷۵	۱۹/۶۰

بحث

تولید ترکیباتی که بصورت موضعی در درمان لیشمانیوز جلدی استفاده شود می‌تواند کمک بزرگی برای غلبه بر مشکلات مربوط به ترکیبات آنتی‌موان باشد که به همین خاطر چندین مطالعه با ترکیبات موضعی برای درمان لیشمانیوز جلدی انجام شده است ولی این تحقیقات هنوز جامع و کامل نبوده و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. از میان بسیاری از مواد شیمیایی که برای درمان لیشمانیوز جلدی در بیماران استفاده شده ترکیب پاروموماسین با کلرید متیل بنزوتونیوم ۱۵٪ ، کلرید بنزوتونیوم ۱۲٪ ، کلرید ستاکونیوم ۱۲٪ یا سولفوکسید دی متیل ۱۲٪ از همه موثرتر بوده است و بقیه مواد یا اثر چشم گیری نداشته و یا سمیت بالایی داشتند(۱۹-۹، ۲۹-۲۱) .

محبعلی و همکارانش در یک مطالعه به اثر بخشی پماد پاروموماسین روی ضایعه ایجاد شده روی قاعده دم موش با لیشمانیا ماژور پرداختند و گزارش کردند که پماد پاروموماسین بر این ضایعات موثراست (۲۴). همچنین در مطالعه‌ای اثربخشی پاروموماسین به همراه جنتامایسین سولفات در درمان ضایعات جلدی موش های BALB/C آلوده به لیشمانیا ماژور به میزان ۸۰ درصد دیده شده است (۲۵). دوز ۱۲۰میلی مولار آرژینین و سیترولین در مقایسه با دوزهای دیگر این داروها قادر به کنترل رشد و تکثیر انگل لیشمانیا در محیط کشت ماکروفاژی و محیط in vivo موشها بوده که این اثر در یک مطالعه که توسط رزمجو و همکارانش انجام شده نشان داده شده است که احتمالا از طریق تحریک تولید NO و سایر سایتوتوکسین‌ها توسط ماکروفاژها بوده است (۲۶).

در مطالعه ای که برای بررسی اثربخشی آمفوتریسین B داخل پارافین سفید نرم حاوی کلرید متیل بنزوتونیوم ۱۲٪ بطور موضعی بر روی لیشمانیوز جلدی در موش‌ها انجام شده، این دارو در این مورد موثر نبوده، در صورتی که فرم سیستمیک آن تاثیر داشته است (۱۱). در تحقیقی که روی اثربخشی Sitamaquin dihydrochloride موضعی بر لیشمانیوز جلدی در سال ۲۰۰۶ در لندن انجام شده اثربخشی آن بر روی پروماستیگوت ها در محیط in vitro دیده شده ولی روی موش های BALB/C (محیط in vivo) اثری نداشته است (۱۲) .

همچنین در مطالعه دیگری که در انستیتو پارازیتولوژی کنیا انجام شده اثربخشی trypan "داروی حاوی diminazen" در محیط in vitro بر روی انگلهای لیشمانیا ماژور و لیشمانیا دونووانی بخصوص در غلظت‌های بالا دیده شده و در محیط in vivo نیز روی موش های BALB/C اثر آن در صورت بکارگیری زودرس روی ضایعات پوستی لیشمانیا ماژور بصورت موضعی دیده شده ولی کاربرد آن با تاخیر ۸ هفته ای روی ضایعات، موثر نبوده است (۱۳). در مطالعه دیگری، مقایسه اثربخشی دو داروی موضعی پاروموماسین و فلوکونازول بر روی ضایعات پوستی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا آمازونزیس ایجاد شده روی موش های BALB/C نشان داد که پاروماسین موضعی از فلوکونازول بسیار موثرتر بوده و باعث بهبودی ضایعات بعد از ۲۸ روز از درمان شده ولی فلوکونازول موضعی اثری نداشته است (۲۱). مطالعه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اهواز به اثرعصاره گل ختمی روی فرم پروماستیگوت لیشمانیا در محیط کشت پرداخته که در این مطالعه اثر درمانی مثبت دیده شده اما روی مدلهای حیوانی و انسان تحقیق جامعی صورت نگرفته است (۲۷).

پریفوزین (Perifosine) یک الکیل فسفولیپید جدید است که اثربخشی آن بر روی گونه های مختلف لیشمانیا در محیط in vitro در یک مطالعه دیده شده که اثر آن شبیه Miltefosine و بیشتر از Edelfosine بوده است(۲۸). طی مطالعه ای در سوریه که روی لیشمانیوز جلدی بعمل آمده درمان موضعی با Imiquimod روی بیماران اثربخشی گذرایی بر ضایعات پوستی داشته و بعد از ۴ هفته مجددا بیماری شروع به پیشرفت کرده است(۶). در یک مطالعه که در کانادا بر روی این ماده و متابولیت آن S-28463 انجام شده هیچ نوع اثر درمانی برای آن گزارش نشده است (۷). مطالعات زیادی بر روی انواع ترکیبات پاروموماسین برای درمان لیشمانیوز جلدی انجام شده که اثربخشی ترکیب پاروموماسین ۱۵٪ با متیل بنزوتونیوم ۱۲٪ در زمینه پارافین نرم سفید بیشتر از سایر ترکیبات پاروموماسین بوده است (۸). ماپار و همکارانش در دانشگاه علوم پزشکی اهواز طی تحقیقی که روی اثر اپیوم موضعی (تریاک) در مدل کارآزمایی بالینی روی بیماران انجام داده اند به این نتیجه رسیده اند که این دارو تاثیری در درمان سالک جلدی در انسان ندارد (۲۹).

درمطالعه ای که بر روی موش‌ها انجام شده مشاهده گردید که تجویز داخل صفاقی دوز پایین مورفین به موش باعث تقویت colony stimulating factor (CSFs) شده در حالی که دوز بالای آن باعث مهار تولید CSFs می شود بعلاوه اینکه رسپتورهای اگونیست μ – اپیوئیدی (DAGO) و انتاگونیست های delta اپیوئیدی (DPDPE) به ترتیب باعث تقویت و مهار تولید CSFs می‌شود. بنابراین این دارو در دوزهای پایین باعث سرکوب عفونت لیشمانیوز احشایی (دونووانی) شده در حالی که دوز بالای آن باعث تشدید عفونت می‌شود. در ضمن دیده شده که در روز سی ام درمان با دوز پایین مورفین عفونت لیشمانیوز احشایی کاملا ریشه کن شده در حالی که دوز بالای مورفین باعث تشدید عفونت در هامستر شده است(۲۰).

با توجه به مطالعات فوق که اثرمثبت مورفین در درمان لیشمانیوز احشایی از طریق عملکرد ایمونومودولاتوری دیده شده و با توجه به اثربخشی داروهای ایمونومودولاتور مثل Imiquimod ، احتمال می رفت که مورفین نیز با مکانیسم تقویت سیستم ایمنی بتواند عفونت های پوستی لیشمانیوز (سالک) را سرکوب نماید ولی مطالعه ما آن را تایید نکرد. با توجه به جدول ۱ در همه گروهها (A تا E) اندازه ضایعات در طول زمان افزایش قابل توجه یافته است که با توجه به آزمون واریانس فاکتوریال مخلوط در همه گروهها ، این افزایش اندازه ضایعات در طول ۵ هفته معنی دار بود و این امر نشان می داد زخم ناشی از انگل لیشمانیا در اکثر موشهای مورد آزمایش بطور طبیعی در حال پیشرفت بوده است.

با توجه به آزمون توکی و آزمون Repeated measurement ANOVA ،اختلاف اندازه ضایعات بین گروههای مختلف با هم و با گروه کنترل در فواصل زمانی مشابه و بطورکلی در کل دوره بررسی ، معنی دار نبود. این نتایج نشان داد که استفاده از مورفین چه بصورت ژل موضعی و چه بصورت تزریق داخل صفاقی تأثیری بر بهبودی زخمهای ناشی از لیشمانیا در موش BALB/C نداشته است.

در مطالعات Singal و همکاران که قبلا در خصوص اثر مورفین داخل صفاقی روی لیشمانیوز احشایی (با عامل لیشمانیا دونووانی) انجام گردید مشاهده شد که دوزهای پایین مورفین (۲/۵ mg/kg و ۱/۷۵) به صورت زیر جلدی روی هامسترها و BALB/C باعث بهبود عفونت احشایی با کاهش اندازه طحال و کاهش تعداد لوکوسیت ها و فاگوسیت ها ی داخل پریتوئن شده و برعکس دوزهای بالای مورفین (۵۰mg/kg و ۲۰) اثر متناقضی داشته و باعث تشدید عفونت بصورت بزرگ شدن طحال و افزایش تعداد لوکوسیت‌ها و فاگوسیت‌های داخل صفاقی شده است؛ در این مطالعات نشان داده شده که اثر دوز پایین مورفین بوسیله اثر ایمونومودولاتوری مورفین به کمک سایتوکینها ی اینترلوکین ۱۲ و فاکتور نکروز تومورال و اینترفرون گاما و فاکتورهای رشد سلولی اعمال می شود[۲۰].

اما در مطالعه ما دوز پایین مورفین ۱/۷۵ mg/kg بصورت داخل صفاقی اثری در درمان و پیشگیری از ایجاد ضایعات جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور نداشت و اندازه ضایعات در گروههایی که مورفین داخل صفاقی در آنها استفاده شده (گروههای C وD) با گروه کنترل هیچ تفاوتی نداشت و با وجود درمان اندازه ضایعات رو به رشد بود . با توجه به این یافته ها به نظر می رسد که سلول های التهابی درگیر در واکنش ایمنی علیه لیشمانیا ماژور متفاوت از لیشمانیا دونووانی باشد و به همین خاطر سایتوکین‌های تولید شده توسط مورفین اثری روی سلولهای ایمنی علیه لیشمانیا ماژور ندارد.

تا کنون مطالعات جامعی در زمینه اثر مورفین موضعی روی لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور انجام نشده و فقط شواهدی دال بر تأثیر تریاک بر زخمهای سالک در مناطقی از جنوب شرق کشور بر اساس تجربیات محلی موجود است که با نتایج حاضر متناقض است. با توجه به اینکه مرفین بخشی از ترکیب تریاک است، این احتمال نیز وجود دارد که ماده موثره آن بخش دیگری از ماده تریاک و یا همراهی و تأثیر توأم آن با مورفین باشد. مطالعه اهواز نیز حاکی از این است که اپیوم موضعی (تریاک) در مدل کارآزمایی بالینی روی بیماران تاثیری در درمان سالک در انسان نداشته است.

مطالعه ما نشان داد که مورفین چه بصورت موضعی وچه بصورت تزریق داخل صفاقی در پیشگیری و درمان لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور در موش های BALB/C تاثیری نداشته است. برای اثبات بهتر نتایج این مطالعه پیشنهاد می شود مطالعات مشابهی با دوزها و اشکال مختلف مورفین بصورت تزریقی و موضعی استفاده گردد. همچنین مطالعه روی حیوانات دیگر آزمایشگاهی نظیر موش‌های سوری معمولی آزمایشگاه و هامستر که در آنها انگل لیشمانیا ماژور ایجاد بیماری می کند استفاده گردد زیرا در موش‌های BALB/C رشد انگل لیشمانیا ماژور سریع بوده و گاهی ایجاد ضایعات منتشر و احشایی می کند ولی در موش‌های سوری سرعت رشد انگل کم بوده و به مدت طولانی بصورت جلدی باقی می ماند. همچنین با توجه به اینکه ممکن است ترکیبات دیگر موجود در تریاک روی لیشمانیا ماژور موثر باشد توصیه می شود که مواد موجود در تریاک تجزیه و شناسایی شده و از آنها جهت پروژه تحقیقاتی در درمان لیشمانیوزجلدی به صورت موضعی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

هزینه این پژوهش از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تأمین گردیده است. ضمنا، از همکاری صمیمانه مسئولین آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی مرکز بهداشت استان به جهت در اختیار قرار دادن فضا و امکان کشت و تولید انگل لیشمانیا تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1 . Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Abai MR, Ebrahimi B, Zahraei-Ramazani AR, Vafaei-Nezhad R, et al. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J; 2003 Jul 9; 816-26.

2. Motazedian H, Noamanpoor B, Ardehali S. Characterization of Leishmania parasites isolated from provinces of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J; 2002 Mar-May 8; 338-44.

3. Desjux P. Programme for the surveillance and control of leishmaniosis. World Health Organization , 2001. Available from: www.WHO.int/emc/diseases/leish /index.html.

4. Jeronimo SMB, Sousa AQ, Pearson RD. Leishmania species; visceral (kala –azar), cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: Mandel, Douglas, Bennett's. Principle and practice of infectious disease. 6th ed. 2005; P: 3145-3155.

5. Fazaeli A, Fouladi B, Sharifi I. Emergence of cutaneous leishmaniasis in a border area at south-east of Iran: an epidemiological survey. J Vector Borne Dis; 2009 Mar 46; 36-42.

6. Seeberg J, Daoud S, Pammer J. Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with Immiquimod. Int J Dermatol; 2003 42; 576-579.

7. Buart S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463; Efficacy and mode of action. J Infect Dis; 1999 179; 1485-1494.

8. Arana BA, Mendosa CE, Rizzo NR, Kroeger A. Randomized, controlled, double blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbensethonium chloride ointment in Guatemala. Am J Trop Med Hyg; 2001 Nov 65; 466-470.

9. Joseph EL, Geoffery P, Wittzum E. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major in experimental animals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1984 45(6); 745-751.

10. Peterson PK, Molitar TW, Chao CC. The opioid –cytokine connection. J Neuroimmunol; 1998 Mar 83 (1-2); 63-69.

11. Frankenorg S. Efficacious topical treatment for murine cutaneous leishmaniasis with ethanol formulation of amphotricin-B. Antimicrob Agents Chemother; 1998 Dec 42(12); 3092-3096.

12. Garnier T, Brown B, Lawrence M, Simon L. In-vitro studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis. J Pharmacy Pharmacol; 2006 58; 1043-1054.

13. Macharia JC, Bourdicon AJ, Gicheru MM. Efficacy of Trypan; a diminazene based drug as antileishmanial agent. Acta Trop; 2004 92; 267-272.

14. Dina A, Gitman M. Immunomodulatory effect of Morphine; therapeutic implication, Expert Opin Drug Saf; 2005 Jul 4(4); 665-75.

15. Yaha MD, Watson RR. Immunomodulation by morphine and marijuana. Life Sci; 1987 Dec; 41(23); 2503 -2510.

16. Carrigan KA, Lysle DT. Morphin-6 beta-glucoronide induces potent immonomodulation. Int Immunopharmacol. 2001 May; 1(5); 821-31.

17. Singal P, Singal PP. Leishmania donovani amastigote component induced Colony-Stimulating Factor production by macrophages; modulation by morphine. Microb Infect; 2005 Feb; 7(2); 148-56.

18. Singh PP, Singal P. Morphine-induced neuroimmunomodulation in murine visceral leishmaniasis: the role(s) of cytokines and nitric oxide. J Neuroimmune Pharmacol. 2007 Dec;2(4):338-51. Epub 2007 Oct 10.

19. Alavi-Naini R. Topical morphine for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Med Hypotheses; 2008; 70(1); 81-84.

20. Singal P, Knhinkar AG, Singh S, Singh PP; Neuroimmunomodulatory effect of Morphine in Leishmania donovani-infected Hamsters. Neuroimmunomodula; 2002/2003;10; 261-269.

21. Mussi SV, Fernandes AP. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infection by leishmania major and leishmania amazonensis. Parasitol Res; 2006; 10; 394-396.

22. Kroewiecki A, Leon S, Scott P, Abraham D. Activity of azithromycin against Leishmania major in vitro and in vivo. Am J Trop Med Hyg; 2002; 67 (3); 273-277.

23. Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan Species of Leishmania. Antimicrob Agents Chemother; 1993 Dec, 37(12); 2550-2556.

۲۴. محبعلی مهدی، یعقوبی پریسا، هوشمند بدخشان، خامسی پور علی. اثر پماد پاروموماسین تهیه شده در ایران بر لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور در مدل موشی. فصل نامه بیماری های پوست دانشگاه علوم پزشکی تهران زمستان ۱۳۸۲: شماره ۲۶ صفحات ۸۸ تا ۹۴.

۲۵. طلوعی سپیده، حجازی سیدحسین، مستقیم مهیار، صادقیان گیتی, اصیلیان علی, شاطالبی محمد علی. اثر درمانی فیلم های پاروموماسین سولفات به همراه جنتامایسن در درمان ضایعات جلدی موش های BALB/C آلوده به لیشمانیا ماژور. مجله علوم پایه پزشکی ایران بهار ۱۳۸۳: جلد ۷ شماره ۱، صفحات ۱۲ تا ۱۶.

۲۶. رزمجو الهام، زواران حسینی احمد، دلیمی اصل عبدالحسین. مطالعه اثر افزودن آرژینین و سیترولین in vivo وin vitro بر مهار تکثیر انگل لیشمانیا ماژور (L.major) در موش BALB/C .مجله پزشکی کوثر زمستان ۱۳۷۸: جلد ۴ شماره ۴، صفحات ۲۵۹ تا ۲۶۹.

۲۷. مراغی شریف، فیض حداد محمد حسین، لیراوی محمد. بررسی اثر آزمایشگاهی گل ختمی بر روی فرم پروماستیگوت لیشمانیا ماژور. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی استان زنجان بهار و تابستان ۱۳۸۷: شماره ۲۶ و ۲۷، صفحات ۱۵ تا۲۰.

28. Cabrera-serra MG, Lorenzo-Morales J, Marialina Romero. Basilio Valladares. Jose E. Pinero. In vitro activity of perifosine: a novel alkylophospholipid against the promastigote stage of Leishmania species. Parasitol Res; 2007; 100(5); 1155-1157.

۲۹. ماپار علی، کاووسی حسین، دباغ محمد علی. بررسی اثر اپیوم موضعی در درمان سالک. مجله علوم پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز تابستان ۱۳۸۰: چهارم, شماره چهار , صفحه ۲۳-۲۷.