

بررسی درمان ترکیبی پماد موضعی توفاسیتینیب ۲ درصد و گلوکانتیم در درمان ضایعات لیشمانیازیس

مینو تسیبچی

اکرم میرامین محمدی*

علی خامسی پور

سیدابراهیم اسکندری

علیرضا فیروز

سامان احمدنصرالهی

زمینه و هدف: لیشمانیازیس جلدی یکی از معضلات بهداشتی مهم ایران محسوب می‌شود. هنوز واکسن مؤثری علیه لیشمانیازیس انسانی در دسترس نیست و درمان‌های حاضر مبتنی بر دارودرمانی است. درمان‌های معمول سمی و گران هستند و هم‌چنین مقاومت به درمان سبب شده جست‌وجو برای درمان‌های جدید ادامه داشته باشد. توفاسیتینیب یک مهارکننده انتخابی ژانوس کیناز است که مسیر سیگنالی چندین سیتوکین در سیستم ایمنی را مختل می‌کند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر پماد موضعی توفاسیتینیب ۲٪ در بهبودی زخم لیشمانیازیس جلدی در موش‌های Balb/C بود.

روش اجرا: این مطالعه تجربی، با به‌کارگیری داروهای توفاسیتینیب و گلوکانتیم در ۴۰ سر موش Balb/C ماده انجام شد. فرم متاسیکلیک پروماستیگوت لیشمانیا ماژور سویه استاندارد (MRHO/IR/75/ER) به کف پا موش‌ها تزریق شد. پس از ایجاد زخم، موش‌ها به ۴ گروه درمانی توفاسیتینیب، گلوکانتیم، توفاسیتینیب - گلوکانتیم و شاهد بدون درمان تقسیم شدند. طول دوره درمان ۲۸ روز بود و در پایان هر هفته درمانی، قطر زخم اندازه‌گیری می‌شد.

یافته‌ها: پس از پایان درمان در گروه‌های تحت درمان با توفاسیتینیب، کاهش معنی‌داری در اندازه زخم و قطر کف پا نسبت به گروه شاهد بدون درمان مشاهده شد ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که توفاسیتینیب سبب تسریع بهبودی زخم در موش‌های Balb/C می‌شود و مشابه درمان استاندارد گلوکانتیم در بهبودی زخم عمل کرده است. استفاده از داروی توفاسیتینیب به فرم پماد در کاهش قطر زخم ناشی از لیشمانیا ماژور در موش مؤثر بوده و به دلیل سهولت در استفاده و عدم نیاز به تزریقات دردناک، می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای برای درمان بیماران مبتلا به لیشمانیازیس جلدی مطرح باشد.

کلیدواژه‌ها: لیشمانیازیس، توفاسیتینیب، موش Balb/C

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۰۶

پوست و زیبایی؛ تابستان ۱۴۰۲، دوره ۱۴ (۲): ۶۵-۷۰

مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جدام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول:

اکرم میرامین محمدی

تهران، خیابان طالقانی، شماره ۴۱۵

پست الکترونیک:

miramin48@yahoo.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

مقدمه

بدن می‌شود. لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور، شایع‌ترین علل لیشمانیازیس جلدی در مناطق استوایی و نیمه گرمسیری هستند. در لیشمانیازیس پاسخ‌های ایمنی نه‌تنها باعث ایجاد مصنوعیت می‌شود، بلکه هم‌چنین به‌عنوان واسطه ایمونوپاتولوژی نیز عمل می‌کند. سلول‌های CD8 سیتوتوکسیک، پاسخ‌های

لیشمانیازیس عفونت ناشی از انگل لیشمانیا، با نیش پشه خاکی آلوده به انسان منتقل می‌شود که با طیف وسیعی از علائم، نشانه‌ها و درجات شدید همراه است و به‌طور گسترده در بیش از ۱۰۰ کشور، توزیع شده است. لیشمانیازیس جلدی (سالک)، فراوان‌ترین شکل بیماری است که باعث ایجاد ضایعات پوستی در

استاندارد گلوکانتیم بر روی ضایعات جلدی لیشمانیا در موش‌های بلب سی سنجیده می‌شود.

روش اجرا

موش‌های Balb/C ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور تهیه شد.

کشت انگل لیشمانیا ماژور

به‌منظور تهیه انگل L. major سویه واکسن (ER/7/IR-MRHO) مقداری از ترشحات ضایعه موش آلوده برداشت شده و ابتدا در محیط NNN کشت داده می‌شود و بعد از چند روز، وقتی که پروماستیگوت‌ها به حد کافی رشد کردند، پروماستیگوت‌ها را به محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ به همراه ۲۰٪-۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) انتقال داده می‌شود. بعد از اینکه پروماستیگوت‌ها به حد کافی رسیدند، در همان محیط به‌منظور تلقیح به موش پاساژ داده می‌شوند. انگل‌ها در پاساژ ۶-۴ در فاز ایستای رشد برداشت می‌شوند. مرحله ایستا با شمارش روزانه انگل تعیین می‌گردد و مرحله‌ای از رشد است که تعداد انگل زیاد نمی‌شود بلکه شروع به کاهش می‌کند؛ البته شکل ظاهری انگل نیز تغییر می‌کند.

ایجاد ضایعه در موش‌ها

تعداد ۴۰ سر موش ماده Balb/C سن ۸-۶ هفته خریداری کرده، سپس پروماستیگوت‌های انگل L. major در فاز ایستای رشد به هر موش با تعداد 2×10^6 انگل در ۵۰ میکرولیتر در کف پای چپ به‌صورت زیرجلدی تلقیح می‌شود.

ارزیابی بروز ضایعه

به‌منظور ارزیابی بروز ضایعه، کف پای موش‌های تلقیح‌شده با انگل لیشمانیا ماژور هر هفته معاینه می‌شوند و قطر کف پا به‌وسیله کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری می‌شود. وقتی که ضایعات مشهود شد موش‌ها به‌صورت متعادل به‌طوریکه متوسط اندازه

التهابی را فعال کرده که درمان را با مشکل روبرو می‌کند بنابراین، مهار CD8، شدت بیماری را هنگام درمان کاهش می‌دهد و باعث کوچک‌شدن ضایعه می‌شود. همچنین افزایش سایتوکاین اینترلوکین ۴ در شدت بیماری لیشمانیازیس تأثیر دارد^{۱،۲}.

توفاسیتینیب مولکول کوچکی از خانواده مهارکننده ژانوس کیناز است و نشان داده شده که به‌طور مستقیم، سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین ۴ را مهار می‌کند و باعث تضعیف سریع انتقال سیگنال JAK_STAT در کراتینوسیت‌ها می‌شود. این دارو در سال ۲۰۱۲ به‌منظور درمان آرتریت روماتوئید فعال در افرادی که به درمان پاسخ ندانند، به تأیید سازمان غذا و دارو رسید. مزیت اصلی این داروها ساختار کوچک آن‌هاست که به مولکول دارویی اجازه نفوذ سریع از سد پوستی را می‌دهد و آن‌ها را برای فرمولاسیون موضعی مناسب می‌کند. توفاسیتینیب در درمان روماتوئید آرتریت، کولیت اولسراتیو، درماتیت، پسوریازیس، درماتیت و آلوپسی آره‌آتا و ... کاربرد دارد^{۳،۴}.

با توجه به مشکلات، عوارض جانبی و عدم پاسخ مناسب به داروهای رایج در درمان سالک، لزوم یافتن درمان جایگزین خصوصاً درمان‌های موضعی ضروری به‌نظر می‌رسد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۰ اثر درمان موضعی داروی توفاسیتینیب بر روی موش‌های C57BL6 آلوده‌شده با انگل لیشمانیا بررسی شد و مشاهده کردند که درمان با توفاسیتینیب تولیدگر آنزیم GZmB را به‌وسیله سلول‌های CD8 در شرایط In vitro و In vivo کاهش می‌دهد و در نتیجه باعث کاهش اندازه ضایعه شده و در کل، از گسترش ضایعات جلوگیری می‌کند^۵. توفاسیتینیب را می‌توان به‌عنوان یک استراتژی همراه با درمان‌های استاندارد ضدانگلی جهت درمان لیشمانیازیس پوستی استفاده کرد.

در این مطالعه، تأثیر ترکیبی استفاده از پماد موضعی توفاسیتینیب ۲ درصد به همراه درمان

($P < 0.01$). اختلاف قطر کف پا در گروه گلوکانتیم در مقایسه با گروه کنترل نیز معنی‌دار بود ($P < 0.01$). هم‌چنین میانگین قطر کف پا در گروه دریافت‌کننده درمان ترکیبی توفاسیتینیب و گلوکانتیم نیز نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.01$).

بین گروه دریافت‌کننده توفاسیتینیب و گروه گلوکانتیم از نظر قطر کف پا اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). هم‌چنین اختلاف معنی‌داری در قطر کف پا در گروه دریافت‌کننده درمان ترکیبی (توفاسیتینیب و گلوکانتیم) و گروه دریافت‌کننده پماد توفاسیتینیب تنها، مشاهده نشد ($P > 0.05$). مقایسه نتایج میانگین و انحراف معیار قطر کف پا در موش‌های Balb/C، در ۴ هفته درمان در جدول ۱ آمده است.

از نظر میزان مرگ‌ومیر در گروه کنترل تا هفته پنجم، ۸۰٪ مرگ‌ومیر مشاهده شد. در گروه گلوکانتیم، گلوکانتیم - پماد و پماد تنها، تا هفته پنجم پس از درمان مرگ‌ومیری مشاهده نشد. در هفته ششم، در گروه گلوکانتیم ۲ عدد؛ پماد و گلوکانتیم ۳ و در گروه پماد تنها ۲ مرگ ثبت شد. مرگ‌ومیر گروه‌های درمان در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود؛ اما اختلاف معنی‌داری بین میزان مرگ‌ومیر موش‌ها در بین گروه‌های درمان مشاهده نشد.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار اندازه قطر کف پا (سانتی‌متر) در موش‌های Balb/C آلوده با L.major درمان‌شده با پماد توفاسیتینیب، گلوکانتیم و گلوکانتیم+توفاسیتینیب و گروه کنترل.

هفته	گروه کنترل	گلوکانتیم	توفاسیتینیب	گلوکانتیم+توفاسیتینیب
۰	۴/۰۳±۱/۱	۳/۹۳±۰/۲۶	۳/۹۵±۰/۳۸	۴/۰۱±۰/۴۱
۱	۴/۳۵±۰/۱۱	۴/۳۱±۰/۱۵	۴/۴۵±۰/۳۳	۴/۳۷±۰/۳۵
۲	۴/۴۵±۱/۴۶	۳/۶۲±۰/۲۳	۴/۲۵±۰/۳۵	۴/۲۱±۰/۴۶
۳	۵/۴۵±۱/۰۶	۳/۶۷±۰/۴۳	۳/۸۹±۰/۲۵	۳/۹۶±۰/۳۶
۴	۵/۵۵±۰/۶۰	۳/۳۰±۰/۲۶	۳/۲۶±۰/۴۴	۳/۳۲±۰/۲۰

ضایعه در گروه‌های مختلف مساوی باشد، در هر گروه ۱۰ سر موش قرار می‌گیرد.

تیمار موش‌ها

موش‌ها به گروه‌های ذیل تقسیم شدند: گروه ۱، ۱۰ سر موش تحت درمان موضعی روزانه با پماد توفاسیتینیب روزی دو بار به مدت ۲۸ روز؛ گروه ۲، ۱۰ سر موش تحت درمان با گلوکانتیم روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن داخل صفاقی به مدت ۲۸ روز دریافت می‌کنند؛ گروه ۳، ۱۰ سر موش به‌عنوان شاهد تنها انگل دریافت می‌کنند و گروه ۴، گلوکانتیم با دز کمتر به‌صورت صفاقی و توفاسیتینیب به صورت موضعی دریافت می‌کنند.

ارزیابی درمان

به‌منظور ارزیابی اثرات درمانی بر روی ضایعات، موش‌ها هر هفته از نظر اندازه و شکل ضایعه بررسی می‌شوند. اندازه و شکل ضایعه در کف پای موش‌ها هر هفته اندازه‌گیری و ثبت می‌شود. اندازه ضایعه از تفاوت بین اندازه پای تلقیح‌شده با انگل (پای چپ) از پای تزریق‌شده با PBS محاسبه می‌شود. میزان مرگ‌ومیر و علت مرگ نیز در هر گروه ثبت می‌شود. نتایج از نظر آماری بین گروه‌ها مقایسه می‌گردد.

آنالیز آماری

برای مقایسه میانگین قطر زخم‌ها، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (oneway-Anova) با سطح اطمینان ۰/۰۵ استفاده می‌شود.

یافته‌ها

در گروه شاهد درمان‌نشده، همه موش‌های آلوده، به‌تدریج افزایش در قطر کف پا و زخمی‌شدن را نشان دادند و تمام موش‌ها تا پایان ۴ هفته زخمی شدند. میانگین تغییرات قطر کف پا در گروه آلوده تحت درمان با پماد توفاسیتینیب در مقایسه با گروه کنترل، از هفته سوم پس از درمان کاهش معنی‌داری داشت

بحث

مطالعه ما نشان داد که میانگین قطر زخم کف پا در موش‌های تحت درمان با توفاسیتینیب به‌تنهایی یا ترکیب با گلوکانتیم قادر به کاهش قطر کف پا در مدت درمان بود و مشابه درمان با گلوکانتیم که داروی مرسوم و استاندارد مورد استفاده در درمان لیشمانیا ماژور است عمل کرد، درحالی که در گروه بدون درمان، افزایش در قطر کف پا مشاهده شد که این، تأثیر داروی توفاسیتینیب را بر روی انگل لیشمانیا ماژور نشان می‌دهد.

به‌نظر می‌رسد پماد توفاسیتینیب در درمان ضایعات لیشمانیازیس در موش Balb/C به‌صورت تنها به‌حد کافی مؤثر بوده و مشابه درمان استاندارد گلوکانتیم عمل کرده و درمان ترکیبی آن با گلوکانتیم تفاوت چندانی در اثربخشی آن ندارد. مصرف پماد به‌دلیل نداشتن درد و عوارض ناشی از تزریق و استفاده آسان می‌تواند گزینه مطلوب‌تری برای درمان لیشمانیازیس باشد. استفاده موضعی توفاسیتینیب می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی برای درمان بیماری لیشمانیوز جلدی در ترکیب با داروهای ضدانگلی در نظر گرفته شود و از آنجایی که استفاده موضعی از مهارکننده‌های jak در سایر بیماری‌های پوستی بدون شواهدی از سمیت سیستمیک استفاده شده است^۱، استفاده موضعی از توفاسیتینیب می‌تواند به‌عنوان یک گزینه برای درمان لیشمانیازیس جلدی همراه با داروهای ضدانگلی استاندارد در نظر گرفته شود.

ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی اولین خط درمان برای لیشمانیازیس جلدی است؛ اما محدودیت‌های متعددی مانند سمیت قلبی، پانکراتیت و سمیت کبدی دارند. هم‌چنین شکست درمان در بیماران رو به افزایش است^۲. از آنجایی که شدت بیماری با پاسخ‌های التهابی بیمار مرتبط است، درمان‌هایی که چنین پاسخ‌هایی را مسدود می‌کنند، ممکن است شدت بیماری را کاهش دهند. مهارکننده‌های ژانوس کیناز (از جمله توفاسیتینیب) کلاسی از داروهای هستند که التهاب را در بدن کاهش می‌دهند^۳. در حال حاضر توفاسیتینیب برای بیماری‌های خودایمنی مانند آرتریت روماتوئید و کولیت اولسراتیو به‌صورت خوراکی استفاده می‌شود. هم‌چنین برای درمان بسیاری از بیماری‌های پوستی استفاده شده است^۴. به‌عنوان مثال، پسوریازیس یک اختلال پوستی خودایمنی است که در آن سیتوکین‌هایی مانند TNF، IL-17 و IL-23 نقش اصلی را ایفا می‌کنند و در کارآزمایی بالینی بیماران تحت درمان با توفاسیتینیب، بهبود قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل نشان دادند^{۵،۶}. هم‌چنین در انسان توفاسیتینیب در کاهش علائم و درمان آلپوسی آره‌آتا، مؤثر بوده است^۷.

در مطالعه Novais و همکاران، درمان موش‌ها با توفاسیتینیب جنبه‌های پاتولوژیک لیشمانیازیس را در موش بهبود بخشید، درحالی که تغییری در تولید IFN- γ توسط سلول‌های Th1 ایجاد نکرد^۸.

References

1. Alvar G, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7:5.
2. Scott P, Novais F. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2016; 581-92.
3. Almanzar G, Kienle F, Schmalzing M, et al. Tofacitinib modulates the VZV-specific CD4+ T cell immune response in vitro in lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol* 2019; 58: 2051-060.
4. Alves NL, Hooibrink B, Arosa FA, et al. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. *Blood* 2003; 102: 2541-546.

5. Novais FO, Nguyen BT, Scott P. Granzyme B inhibition by tofacitinib blocks pathology induced by CD8 T cells in cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 2021; 141: 575-85.
6. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin J-C, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0006052.
7. Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Disc* 2017;16: 843-62.
8. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 227-55.
9. Kennedy CM, Ko JM, Craiglow BG, et al. Safety and efficacy of the JAK inhibitor tofacitinib citrate in patients with alopecia areata. *JCI Insight* 2016; 1: e89776.
10. Tian F, Chen Z, Xu T. Efficacy and safety of tofacitinib for the treatment of chronic plaque psoriasis: A systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res* 2019 ;47: 2342-350.

Evaluation of the combined treatment of topical tofacitinib 2% ointment and glucantim in the treatment of leishmaniasis lesions

Minoo Tasbihi, PhD
Akram Miraminmohammadi, PhD*
Ali khamesipour, PhD
Seyedebrahim Eskandari, PhD
Alireza Firooz, MD
Saman Ahmadnasrollahi, PhD

Center for Research & Training in Skin Diseases & Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: Aug 16, 2023
Accepted: Aug 28, 2023
Pages: 65-70

Background and Aim: Cutaneous leishmaniasis is one of the most important health problems in Iran. There is still no effective vaccine available against human leishmaniasis and current treatment is based on chemotherapy. Conventional drugs are toxic and expensive, and drug resistance has caused the search for new treatments. Tofacitinib is a Janus kinase inhibitor that disturbs the signaling pathway of several cytokines in the immune system. The aim of this study was to evaluate the effect of topical tofacitinib 2% ointment in healing cutaneous leishmaniasis in Balb/C mice.

Methods: This experimental study was performed using tofacitinib and glucantim drugs in 40 female Balb/C mice. The metacyclic form of promastigote of *Leishmania major* standard strain (MRHO/IR/75/ER) was injected into the footpad of the mice, the mice were divided into 4 treatment groups: tofacitinib, glucantim, tofacitinib-glucantim and control without treatment. The treatment period was 28 days. The footpad thickness of all groups was measured at the end of each week.

Results: After the end of the treatment in the groups treated with tofacitinib, a significant decrease in the size of lesion and the footpad thickness was observed compared to the control group without treatment ($P < 0.01$).

Conclusion: It seems that tofacitinib ointment accelerates lesion healing in Balb/C mice and has worked similarly to standard glucantim treatment. Ointment can be a better option for leishmaniasis treatment and due to its ease of use and no need for painful injections it can be considered as an option for the treatment of patients with cutaneous leishmaniasis.

Keywords: leishmaniasis, tofacitinib, balb/c mice

Corresponding Author:

Akram Miraminmohammadi, PhD

No. 415, Taleqani Ave., Tehran, Iran
Email: miramin48@yahoo.com

Conflict of interest: None to declare

