

اثر بیوشیمیایی داروی ال-آرژنین (L-Arg) به عنوان پیش ساز نایتریک اکساید و تاثیر مهارکنندگی ایندومتاسین (INDO) بر پروستاگلاندین (PG) در فیزیوپاتولوژی موش های حساس Balb/c آلوده به لیشماتیا ماژور

*فاطمه قاسمی^۱، حسین نهروانیان^۲

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۹۱/۹/۱۵

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۹۱/۷/۴

چکیده

سابقه و هدف: لیشماتوز به انواع احشایی، جلدی و جلدی- مخاطی قابل تفکیک است. لیشماتیا ماژور یکی از عوامل لیشماتوز جلدی می باشد. این مطالعه جهت بررسی اثر بیوشیمیایی داروی ال-آرژنین به عنوان پیش ساز اکسید نیتریک در موش های Balb/c آلوده به لیشماتیا ماژور و تاثیر مهارکنندگی ایندومتاسین بر پروستاگلاندین صورت گرفته است.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی موش های Balb/c و انگل لیشماتیا ماژور صورت گرفت. در این مطالعه ۴۸ سر موش Balb/c در ۶ گروه هشت تایی مورد استفاده قرار گرفت. ۱- گروه کنترل سالم که شامل موش های سالم ۲- گروه کنترل آلوده، شامل موش های آلوده به لیشماتیا ماژور، تحت درمان با اتانول ۳- گروه آزمون، شامل موش های آلوده به لیشماتیا ماژور، تحت درمان با ایندومتاسین ۴- گروه کنترل آلوده، شامل موش های آلوده به لیشماتیا ماژور، تحت درمان با آب مقطر ۵- گروه آزمون شامل: موش های آلوده به لیشماتیا ماژور، تحت درمان با ال-آرژنین ۶- گروه شاهد شامل موش های آلوده به لیشماتیا ماژور، تحت درمان با ایندومتاسین و ال-آرژنین انجام شد. میزان غلظت نایتریک اکساید بوسیله سنجش گرایس، اندازه گیری شد. و با استفاده از آزمون های آماری Student's t-test و ANOVA One Way مورد آنالیز قرار گرفت. این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی می باشد.

یافته ها: غلظت نایتریک اکساید در گروه ۴ $4 \mu\text{M/ml}$ 157.2 ± 22.37 ، در صورتی که در گروه درمانی ال-آرژنین، ایندومتاسین یعنی گروه ۶ این میزان به $62.06 \pm 13.88 \mu\text{M/ml}$ کاهش یافت. آنالیز داده ها بیانگر اختلاف معنی دار در میزان نایتریک اکساید سرم خون مربوط به گروه شاهد و آزمون در اثر درمان با ال-آرژنین، ایندومتاسین می باشد. قطر زخم ها در گروه شاهد 6.51 ± 1.25 میلی متر بوده در حالی که در گروه تحت درمان به وسیله ایندومتاسین، این میزان به 4.29 ± 0.95 میلی متر کاهش یافت.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که بکارگیری ایندومتاسین و ال-آرژنین موجب تغییر میزان پروستاگلاندین و نایتریک اکساید در میزبان و آشکار شدن نقش تعاملی آنها در فیزیوپاتولوژی موش های آلوده به لیشماتیا شد که شامل طول دوره بیماری، خصوصیات ماکروسکوپی و اندازه زخم لیشماتیایی و اسپلنومگالی می باشد.

کلمات کلیدی: لیشماتیا ماژور، نایتریک اکساید، ال-آرژنین، ایندومتاسین

مقدمه

که به وسیله انگل لیشماتیا ایجاد می شود. بر طبق گزارش سازمان

بهداشت جهانی، در ۸۸ کشور آلوده به این انگل، حدود ۱۲ میلیون

لیشماتوز پستی یک عفونت مزمن و بیماری گرانولوماتوز است

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی (*نویسنده مسئول)
تلفن: ۰۲۱-۸۵۹۵۲۲۰۲ آدرس الکترونیک: elhamgha_2007@yahoo.com

۲- استادیار، ایران، تهران، بخش انگل شناسی و انستیتو پاستور ایران، بخش انگل شناسی

ال - آرژنین (L-Arg) به وسیله آنزیم نایتریک اکساید (NOS) سنتتاز تولید شود (۱۰). که در این واکنش ال - آرژنین به ال - سیترویلین تبدیل می شود. شواهدی مبنی بر اینکه NO در فعالیت ضد میکروبی ماکروفاژها بر علیه تعدادی از پاتوژن های درون سلولی دخالت می کند، وجود دارد آن پیشنهادکننده اینست که افزایش سطح NO در زخم های لیشمانیایی سبب کاهش تعداد انگل می شود (۱۱).

مسیر سیکلواکسیژناز (Cox: Cyclooxygenase) متابولیسم اسید آراشیدونیک، منجر به تولید پروستاگلاندین ها می شود. پروستاگلاندین ها (PG) حاوی یک حلقه پنج کربنه در زنجیره اسید آراشیدونیک می باشند. با کشف ایزوزوم های (Cox-۱, Cox-۲) مشخص گردید که این ایزوفرم ها تنظیمات و عملکردهای متفاوتی را نشان می دهند. Cox-۱ نقش هومئوستاتیک داشته، و به طور قابل ملاحظه ای در تعدادی از انواع سلول ها بیان می شود. در حالی که Cox-۲ یک پاسخ ژنی اولیه است که در تعداد کمی از بافت ها مثل کلیه و نخاع یافت می شود (۱۲).

فعالیت ضد التهابی، داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی NSAID ها عمدتاً به واسطه مهار بیوسنتز پروستاگلاندین ها اعمال می گردد. مهار کننده های Cox-۲ شامل: سلکوکسیب، روفکوکسیب و والدکوکسیب، و مهارکننده های Cox-۱ شامل آسپرین، ایندومتاسین، پیروکسیکام و سولینداک می باشند در حالی که ایبوپروفن و مکلوفنات، هر دو ایزوآنزیم را به یک نسبت مهار می کنند (۱۳).

ایندومتاسین در سال ۱۹۶۳ معرفی شد. این دارو یک مهار کننده قوی COX است. با کاهش آنزیم های لازم، سنتز پروستاگلاندین را مهار کرده و به وسیله مهار سنتز پروستاگلاندین ها اثرات تسکینی و ضد التهابی و ضد تب ایجاد می کند (۱۴، ۱۵). مطالعه حاضر، نخستین طرح در خصوص بررسی گونه ایرانی لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/۷۵/ER و ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی، پارازیتولوژیک، پاتوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی L-Arg به عنوان داروی پیش سازنیتریک اکساید و ایندومتاسین به عنوان مهار کننده PG، در یک مطالعه واحد می باشد.

مواد و روش ها

حیوان آزمایشگاهی استفاده شده

موش Balb/c (inbred) نر (تهیه شده توسط واحد حیوانات آزمایشگاه

انسان آلوده وجود دارد و حدود ۳۵۰ میلیون انسان را خطر ابتلا به این بیماری تهدید می کند (۱). علی رغم تمام تلاش های انجام شده هنوز یکی از مشکلات بهداشتی جهان و منطقه می باشد (۲). انگل لیشمانیا یک پاتوژن داخل سلولی است که می تواند باعث طیف وسیعی از بیماری های انسانی از یک زخم پوستی تا عفونتهای احشایی را سبب شود (۳). که با گزش پشه خاکی آلوده به میزبان پستاندار از جمله انسان منتقل می شود.

چرخه زندگی تمام گونه های لیشمانیا شامل دو مرحله است: یکی مرحله تازک دار و به عبارتی پروماستیگوت های متحرک که قادرند در بیرون سلول های معده پشه خاکی زندگی کنند و مرحله بعد هم در سلول های پستانداران که پروماستیگوت ها درون ماکروفاژهای میزبان مهره دار به فرم آماستیگوت تبدیل می شوند (۴).

حساسیت و مقاومت به عفونت لیشمانیایی هستند که به خصوص در بیماری های حاصل از لیشمانیا ماژور (L. major) بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. سویه موش های C57BL/۶، CBA، آلوده به L. major زخم های پوستی که به طور خودبه خودی بهبود می یابند را ایجاد می کنند، در حالی که موش های DBA/۲، BALB/c زخم های پوستی اولیه ناعلاج را ایجاد کرده و بسیار حساس هستند (۵، ۶).

مقاومت و حساسیت نسبتاً به پیشرفت پاسخ های سلول های T از نوع Th۱ و Th۲ مرتبط هستند. در موش های گونه C57BL/۶ پاسخ ایمنی Th۱ افزایش می یابد که مانع از رشد بیشتر انگل و موجب بروز فنوتیپ خود درمانی می شود. در حالی که در موش های گونه BALB/c پاسخ های Th۲ افزایش می یابد که سبب ایجاد زخم های ناعلاج و پیشرفت بیماری می شود (۷) سلول های موش های مقاوم، IFN-γ، IL-۱۰ و نیتریک اکساید (NO) بیشتری تولید می کنند از طرفی سلول های موش های حساس ایتنرلوکین، پروستاگلاندین (PGE۲) و TGF-B بیشتری تولید می کنند (۸)، در نتیجه الگوی متغیری را در این دو میزبان متفاوت نمایان می سازد.

القای نیتریک اکساید سنتتاز II سلولهای CD۴۵Th۱ فعال شده، TNF-α، IFN-γ را القا کرده که سبب فعال سازی ماکروفاژها و القا نیتریک اکساید سنتتاز II (NOSII) و کشته شدن انگل از طریق تولید NO می شود، در حالی که گونه موش BALB/C مستعد با دارا بودن پاسخ Th۲ اولیه، زخم هایی دارد که به طور خودبخود درمان نشده و بنابراین در این گونه پیشرفت می کند (۹). NO می تواند از اسید آمینه

درمان با اتانول ۰/۴٪، به صورت خوراکی در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی استفاده شد. ۳- گروه آزمون شامل موش های آلوده به *L. major*، که تحت درمان با دوزهای ۰/۰۸ g، ۰/۰۴ ایندومتاسین، در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی استفاده شد.

۴- کنترل آلوده، شامل موش های *Balb/c* آلوده به *L. major*، که تحت درمان با آب مقطر، به صورت در هفته هفتم به جای آب آشامیدنی استفاده شد.

۵- گروه آزمون شامل موش های آلوده به *L. major*، که تحت درمان با دوزهای ۰/۱ g، ۰/۲ ال-آرژنین، به صورت خوراکی در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی انجام شد.

۶- گروه شاهد شامل موش های آلوده به *L. major*، که تحت درمان با دوزهای ۰/۰۸ g، ۰/۰۴ ایندومتاسین و دوزهای ۰/۱ g، ۰/۲ ال-آرژنین در هفته هفتم پس از تلقیح انگل، به مدت دو هفته به جای آب آشامیدنی انجام شد.

اندازه گیری وزن بدن

وزن بدن برحسب گرم پس از تلقیح انگل هر هفته، با استفاده از یک ترازوی کفه بالا اندازه گیری شد.

ارزیابی میزان هپاتواسپلنومگالی

پس از کشتن موش ها به وسیله دی اتیل اتر، در شرایط سترون طحال و کبد از بدن خارج و درون میکروتیوپ قرار گرفته و وزن تر ارگان به وسیله ترازوی دیجیتال اندازه گیری شد و به عنوان شاخص میزان هپاتومگالی و اسپلنومگالی با گروه شاهد (*L. major*) با استفاده از آزمون های آماری ANOVA One Way و Student's t-test مورد آنالیز قرار گرفتند (۱۷).

اندازه گیری میزان بقا

Survival rate بیانگر درصد بقای موش های آزمایش در هر هفته بعد از تزریق است که تفاوت ها به وسیله نرم افزار Graph Pad Prism رسم و مورد مقایسه قرار گرفت.

انستیتو پاستور کرج) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. وزن اولیه بدن $18/2 \pm 1/3$ g میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) بوده و موش ها درون اتاقی با درجه حرارت ($23^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}$) و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با دسترسی نامحدود به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایش ها روی حیوانات بر طبق استانداردهای اخلاقی بیانیه Helsinki انجام شد و روش هایی برای حفاظت حیوانات از درد و ناراحتی مورد استفاده قرار گرفت.

انگل استفاده شده

انگل استفاده شده در این مطالعه *Leishmania major* گونه استاندارد ایران (MRHO/IR/V5/ER) است. که در بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران نگهداری می شود. برای کشت این فرم انگل از محیط دو فاز NNN برای جداسازی اولیه انگل از زخم موش *Balb/c* استفاده شد و سپس کشت انگل در محیط FCS ۱۰٪ + RPMI ۱۶۴۰ عاری از سلول انجام گرفت. قابلیت عفونت زایی انگل ها به وسیله پاساژ منظم در موش *Balb/c* مستعد حفظ شده و انگل ها در محیط نگه دارنده PRMI ۱۶۴۰ کشت داده شده اند. تحت چنین شرایط کشتی، فاز ایستایی رشد انگل در روز ششم به دست آمده است.

کشت انگل *L. major* و آلوده سازی حیوانات با انگل

در این مطالعه به موش های *Balb/C* پروماستیگوت *L. major* در RPMI بدون FCS به صورت زیر جلدی (s.c.) در قاعده دم حیوان تزریق گردد که به زخم نسبتاً بزرگی تبدیل شد که سپس متاستاز یافته و حیوان را کاملاً آلوده کرد. بعد از بالا آمدن زخم، به هر یک از گروه های آزمون غلظت مطلوب از داروی مورد نظربر حسب (mg/Kg/BW) را تجویز کردیم.

گروه ها و آزمایش ها

تعداد کل حیواناتی که در این مطالعه استفاده شد، ۴۸ سر موش *Balb/c* در ۶ گروه (در هر گروه ۸ سر موش) که بجز گروه ۱ بقیه گروه ها را با تزریق انگل *L. major* آلوده کردیم.

۱- گروه کنترل سالم (Naïve)، که شامل موش های *Balb/c* سالم، جهت مقایسه با گروه آلوده بوده است.

۲- کنترل آلوده، شامل موش های *Balb/c* آلوده به *L. major*، که تحت

اندازه گیری زخم

اندازه زخم به صورت هر هفته بعد از ظهور زخم به وسیله کولیس مدرج دیجیتال بر حسب میلی متر (mm) و در دو بعد افقی و عمودی (D,d) اندازه گیری شد و اندازه (mm) بر طبق فرمول $S = (D+d)/2$ تعیین گردید (۱۷). که این عمل هر هفته پس از ظاهر شدن زخم‌ها به مدت ۶ هفته متوالی صورت گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism رسم و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA One Way و Student's t-test مورد آنالیز قرار گرفتند.

آماده سازی سرم و سوسپانسیون بافتی

جهت جداسازی سرم موش‌های هر شش گروه را به طریقه بیهوشی منجر به مرگ کشته و از قلب آنها به وسیله سرنگ انسولین، در حدود ۱ ml خونگیری کردیم. نمونه خون را به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ در دستگاه میکروفیوژ قرار داده و سپس به وسیله سمپلر محلول رویی آن را جدا کردیم، بدین ترتیب سرم خون حاصل شد. به منظور تهیه سوسپانسیون از نمونه‌های بافتی به دست آمده (کبد و طحال) میزان ۰/۱ gr از بافت طحال و ۰/۲ gr از بافت کبد را بوسیله تیغ و ترازوی دیجیتال جدا کرده و با استفاده از دستگاه هموژنایزر درون میکروتیوپ کاملاً هموژنیزه کرده، پس از افزودن ۱ cc آب مقطر استریل (DW) به آن، در نهایت سوسپانسیون حاصله را درون Shaker قرار داده تا کاملاً یکنواخت شود. برای اندازه گیری میزان RNI در یک گرم (Wet Weight of Liver/Spleen) $\mu\text{M/g}$ از بافت کبد و طحال نتایج آزمایش را به ترتیب برای کبد و طحال ۵ و ۱۰ برابر کردیم. و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA One Way و Student's t-test مورد آنالیز قرار گرفتند.

Griess Micro Assay (GMA)

واکنش گرایس همراه با تغییراتی از روشی که توسط نهروانیان و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای سنجش نیتريت بکار رفته، اقتباس شده است. نیتريت (NaNO_2) به‌طور مستقیم بوسیله سنجش گرایس، با استفاده از محلول گرایس و TCAA، اندازه گیری شد (۱۷).

رسم منحنی استاندارد و روش انجام واکنش گرایس

به منظور تعیین اثر داروی ال-آرژنین و ایندومتاسین بر غلظت

واسطه‌های نیتروژن فعال (RNI) در سرم خون و سوسپانسیون‌های کبد و طحال مربوط به هر یک از گروه‌های آزمون و شاهد، ابتدا محلول‌هایی استاندارد را با ۱۰ غلظت مختلف NaNO_2 تهیه و منحنی استاندارد آنرا رسم کردیم، بدین طریق که ابتدا درون ۱۰ اپندروف (۱/۵ میلی لیتر) میزان $200 \mu\text{L}$ آب مقطر استریل ریخته و سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول NaNO_2 یک میلی مولار به اپندروف اول اضافه کرده و از آن پس، هر بار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اول را جایگزین همین مقدار محلول در اپندروف‌های بعدی کردیم و در نهایت از لوله آخر ۲۰۰ میکرولیتر از محلول را بدور ریختیم. غلظت‌های نهایی حاصل برای NaNO_2 به ترتیب و ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸، ۳/۹، ۱/۹۵ و ۰/۹ μM در هر یک از ۱۰ لوله استاندارد می‌باشد. سپس به هر یک از لوله‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول گرایس (اسید فسفریک ۵٪، سولفانلیک اسید ۱٪ و $\text{N} (1 - \text{نفتیل} - ۱)$) اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید، (NED) اضافه کردیم و به مدت ۵ دقیقه درون Shaker قرار دادیم تا بخوبی مخلوط شد. محلول نهایی حاصل را به مدت ۵ دقیقه و RCF ۱۳۰۰ درون سانتریفیوژ قرار داده و از مایع رویی لوله‌ها، ۱۵۰ میکرولیتر برداشته و به وسیله سمپلر ۲۰۰، به درون چاهک‌های ته صاف میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در یک ردیف منتقل کردیم. جذب محلول‌های استاندارد را در ۵۲۰ nm با استفاده از دستگاه قرائت گر میکروپلیت (micro plate reader) خواندیم و در نهایت منحنی استاندارد محلول نیتريت سدیم (NaNO_2) که در غلظت‌های مشخص دارای جذب معینی می‌باشد، رسم گردید. بدین ترتیب، در نمونه‌های سرم و سوسپانسیون‌های کبد و طحال با RNI نامشخص، جهت تعیین مقدار نیتريت میتوان از این منحنی استاندارد استفاده کرد.

در مرحله بعدی، به منظور تعیین مقادیر RNI در نمونه‌های مجهول بیماران، ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم خون موش‌های آلوده گروه‌های T و C را با ۵۰ میکرولیتر واکنشگر گرایس مخلوط کرده و پس از قرار دادن درون Shaker و انکوبه کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، پروتئین‌های آن با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر (TCAA) تری کلرواستیک ۱۰٪ ته نشین شد. محلول حاصله مانند مرحله تولید محلول استاندارد، به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰ دور سانتریفیوژ قرار گرفت و از محلول رویی آن ۱۵۰ میکرولیتر برداشته و درون میکروپلیت وارد کردیم و پس از اندازه گیری جذب نوری نمونه‌ها

بافت طحال، در گروه ۲ به عنوان گروه شاهد از 0.227 ± 0.020 به 0.128 ± 0.017 ، در گروه آزمون یعنی گروه ۳ کاهش یافت یعنی ایندومتاسین در این غلظت، تاثیر پاتوفیزیولوژیک معنی داری بر طحال موش های گروه آزمون با گروه شاهد داشت. L-آرژنین در گروه ۴ به عنوان گروه شاهد از 0.149 ± 0.006 به 0.262 ± 0.028 ، در گروه آزمون یعنی گروه ۵ افزایش یافت. که افزایش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد داشت. و همچنین ترکیب دارویی L-آرژنین و ایندومتاسین در گروه ۶ به عنوان گروه آزمون از 0.149 ± 0.006 در گروه ۴ و 0.227 ± 0.020 در گروه ۲، به عنوان گروه های شاهد، به 0.051 ± 0.259 در گروه آزمون یعنی گروه ۶ افزایش یافت. که افزایش معنی داری در مقایسه با گروه های شاهد داشت. (شکل ۱) آنالیز آماری داده ها با استفاده از آزمون ANOVA و Student's t-test تفاوت معنی داری در میزان اسپلنومگالی بین دو گروه شاهد و آزمون نشان داد. اختلاف معنی داری ($P < 0.001$) بین گروه های شاهد و آزمون آلوده به لیشرمانیا ماژور مشاهده شد.

بررسی مقایسه ای اندازه زخم (Lesion Size) در گروه های آزمون و شاهد

پس از اندازه گیری قطر زخم ها در دو بعد، میانگین قطر زخم ها در گروه شاهد 1.25 ± 0.51 میلی متر بوده در حالی که در گروه آزمون تحت درمان به وسیله ایندومتاسین، این میزان به 0.95 ± 0.29 میلی متر کاهش یافته است. تفاوت معنی داری در مقایسه قطر زخم های گروه درمانی ایندومتاسین و همچنین گروه شاهد پس از درمان مشاهده شد. و اختلاف معنی داری ($P < 0.001$) از طریق تست Student's t-test به دست آمد. (شکل ۲) همچنین میانگین قطر زخم ها در گروه ۴ به عنوان شاهد در روز هفته یازدهم پس از تلقیح 0.95 ± 0.496 میلی متر بود در حالی که در گروه ۵ به عنوان آزمون درمان شده به وسیله L-آرژنین، این میزان به 0.97 ± 0.16 میلی متر افزایش یافت. (شکل ۲)

سنجش RNI در نمونه های سرم خون گروه های آزمون و شاهد به روش میکروگرایس (GMA)

در اندازه گیری های انجام شده میانگین غلظت RNI در گروه ۲ 22.37 ± 15.7 $\mu\text{M/ml}$ و در گروه ۴ 11.27 ± 18.41 $\mu\text{M/ml}$ ، به عنوان

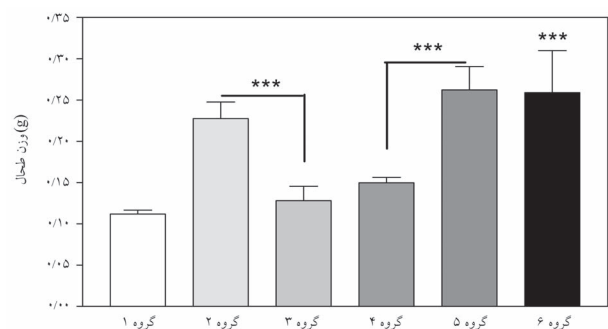
در 540 nm با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده، میزان غلظت RNI تعیین گردید. پس از تعیین غلظت RNI، نتایج به وسیله نرم افزار Graph Pad Prism رسم و اطلاعات خام حاصله با روش های آماری t-test student's و One Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

روش Enzymatic جهت اندازه گیری میزان پروستاگلاندین: پروستاگلاندین بر اساس روش آنزیماتیک ایمونواسی (High Sensitivity Prostaglandin E₂ Enzyme Immunoassay Kit) ارزیابی قرار گرفت در این روش از آنزیم و سوبسترا استفاده شد و در انتهای روش Optical Density نمونه ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر با دستگاه اکسپکتروفوتومتر خوانده شدند. نتایج با روش های آماری t-test student's و One Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۸).

یافته ها

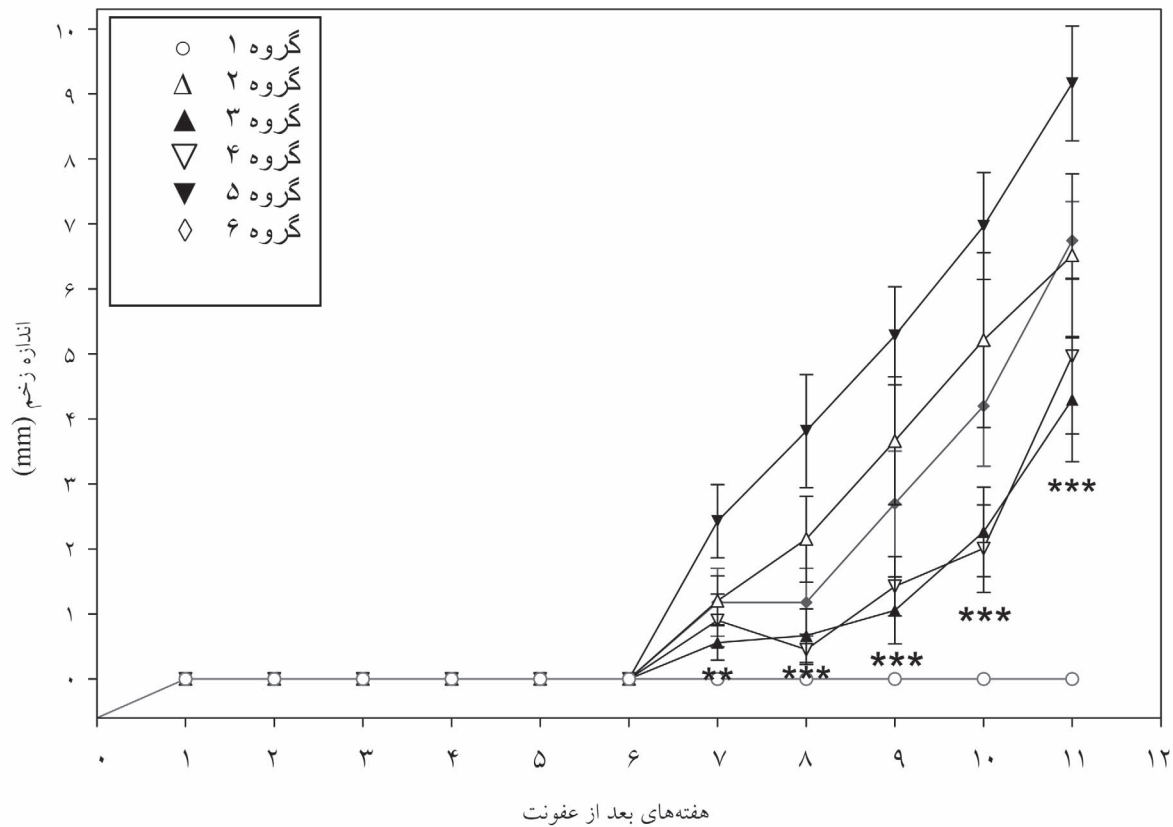
باتوجه به غلظت موثر و ضد لیشرمانیایی داروی L-آرژنین و ایندومتاسین با در نظر گرفتن ظرفیت تحمل حیوان زنده و عوارض جانبی احتمالی دارو، از دو غلظت دارویی شامل 0.1 g در هفته اول و 0.2 g در هفته دوم مطالعات برای ال-آرژنین و همچنین از ایندومتاسین هم با دو غلظت دارویی شامل 0.04 g در هفته اول و 0.08 g در هفته دوم مطالعات استفاده شد.

ارزیابی اسپلنومگالی در گروه های آزمون و شاهد: از علایم پاتوفیزیولوژیک اسپلنومگالی است که در همه گروه های شاهد و آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت. (شکل ۱) میانگین وزنی



شکل ۱- بررسی عوارض پاتوفیزیولوژیک (اسپلنومگالی) در گروه های آزمون و شاهد

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۰۴)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)



شکل ۲- پیشرفت اندازه زخم‌های لیشمانیوز پوستی در گروه‌های آزمون و شاهد

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)

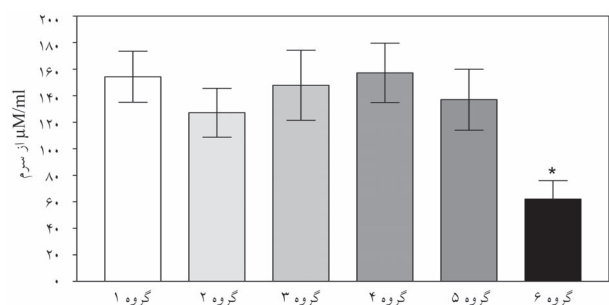
سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی کبد به روش میکروگرایس (GMA)

در مطالعات صورت گرفته با داروی ایندومتاسین، میانگین غلظت RNI در گروه ۲ شاهد $56/40 \pm 7/9$ بوده در صورتی که در گروه ۳ (آزمون) این میزان به $27/89 \pm 5/6$ میکرومول بر گرم کاهش یافت. آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی کبد، مربوط به این دارو بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین نشان داد. (شکل ۴) آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی کبد، با $P < 0/05$ مربوط به داروی ایندومتاسین بین گروه‌های شاهد و آزمون نشان داد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism و آزمون Student's t-test انجام شد.

سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی طحال به روش میکروگرایس (GMA)

میانگین غلظت RNI در گروه ۲ به عنوان شاهد $34/59 \pm 3/1$ بوده در

گروه‌های شاهد بوده در صورتی که در گروه درمانی ایندومتاسین، L-Arg یعنی گروه ۶ (آزمون) این میزان به $62/06 \pm 13/88$ میکرومول بر میلی لیتر کاهش یافت آنالیز آماری داده‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در میزان RNI سرم خون مربوط به گروه شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین، L-Arg نشان بود. (شکل ۳) آنالیز آماری داده‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در غلظت RNI سرم با $P < 0/05$ بین موش‌های گروه شاهد و آزمون پس از درمان ایندومتاسین، L-Arg نشان بود.



شکل ۳- سنجش RNI در نمونه‌های سرم خون موش‌های Balb/c در گروه‌های آزمون و شاهد

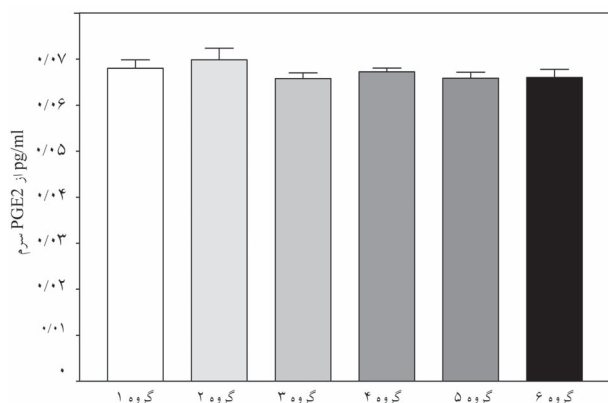
گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۰/۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)

میزان به $48/29 \pm 13/3$ میکرومول بر گرم افزایش یافت. (شکل ۵) آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی طحال، مربوط به این داروها بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین، L-آرژنین نشان داد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism و آزمون Student's t-test انجام شد.

بررسی تاثیر دارویی ایندومتاسین INDO، بر میزان پروستاگلندین (PG) در نمونه‌های سرم خون مربوط به گروه‌های آزمون و شاهد به روش الایزا

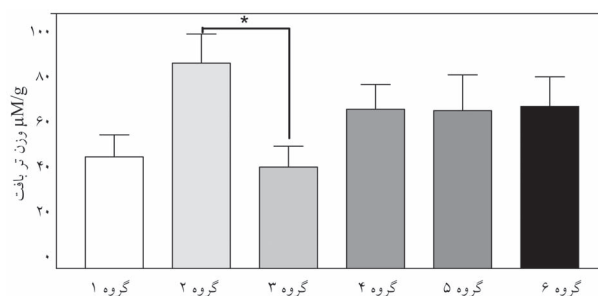
میزان غلظت PG در گروه ۲ به عنوان شاهد آلوده به L. major نسبت به گروه ۳ به عنوان آزمون آلوده به L. major به وسیله آنالیز آماری داده‌ها تفاوت معنی داری را در این مورد نشان نمی‌داد. به‌طوری که آنالیز آماری نتایج با استفاده از آزمون آماری Student's t-test و برنامه کامپیوتری Graph pad prism نشان دهنده تفاوت معنی داری در این خصوص نبود. در بررسی‌های انجام شده، میانگین میزان PG در سرم خون مربوط به گروه‌های شاهد و آزمون به ترتیب $0/07 \pm 0/002$ و $0/066 \pm 0/001$ بود. (شکل ۶)

غلظت PG در هر یک از نمونه‌ها بر اساس منحنی جذب و برحسب پیکوگرم بر میلی لیتر (pg/ml) بیان شد. آنالیز آماری داده‌ها نشان دهنده تاثیر قابل ملاحظه ایندومتاسین بر میزان PG در نمونه سرم گروه آزمون در مقایسه با گروه شاهد نبود. این در حالی است که آلودگی به L. major نیز سبب بالا بردن میزان PG در گروه بیمار بدون درمان



شکل ۶- میزان PG نمونه‌های سرم خون موش‌های Balb/c، گروه‌های آزمون و شاهد به روش الایزا

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)

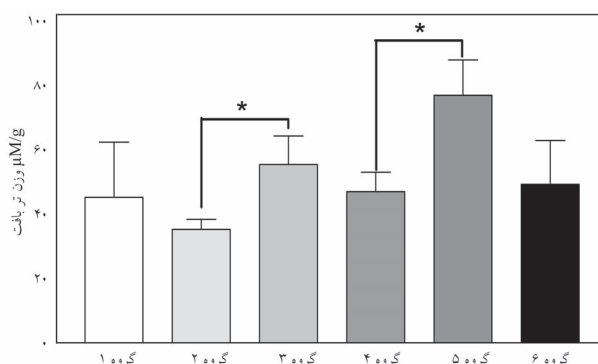


شکل ۴- سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی کبد موش‌های Balb/c در گروه‌های آزمون و شاهد به روش میکروگرایس (GMA)

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)

صورتی که در گروه ۳ به عنوان آزمون این میزان به $54/31 \pm 8/68$ میکرومول بر گرم افزایش یافت. که آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی طحال، مربوط به این دارو با $P < 0/05$ ، بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با ایندومتاسین نشان داد. همچنین در مطالعه بر روی داروی L-آرژنین، میانگین غلظت RNI در گروه ۴ به عنوان شاهد $46/01 \pm 5/93$ بوده در صورتی که در گروه ۵ به عنوان آزمون این میزان به $75/41 \pm 10/79$ میکرومول بر گرم افزایش یافت. که آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی داری در میزان RNI سوسپانسیون بافتی طحال، مربوط به این دارو با $P < 0/05$ ، بین گروه‌های شاهد و آزمون در اثر درمان با L-آرژنین نشان داد. (شکل ۵)

ترکیب دارویی ایندومتاسین، L-آرژنین میانگین غلظت RNI در گروه‌های شاهد $54/31 \pm 8/68$ و $46/01 \pm 5/93$ بوده در صورتی که در گروه ۶ درمانی با ایندومتاسین، L-آرژنین به عنوان آزمون این



شکل ۵- سنجش RNI در نمونه‌های سوسپانسیون بافتی طحال موش‌های Balb/c به روش (GMA)

گروه ۱ (Naive)، گروه ۲ (اتانول ۴٪ + L. major)، گروه ۳ (L. major + INDO)، گروه ۴ (آب مقطر + L. major)، گروه ۵ (L. major + L-Arg)، گروه ۶ (L. major + L-Arg + INDO)

این کاهش به صورت معنی داری ($P < 0.05$) تنها در سطح NO کبد مربوط به INDO دیده می شود. باتوجه به نتایج به نظر می رسد که کبد RNI را متابولیتی دفعی در نظر گرفته و با دفع آن سبب کاهش سطح آن گردیده است.

ولی الگوی تاثیر گذاری بر روند تولید NO به نظر می رسد که در کبد و طحال با یکدیگر متفاوت باشد. به طوری که INDO در کبد نقش بازدارنده تولید NO را بازی می کند. و L-Arg موجب افزایش میزان NO اما نه به شکل معنی دار شده است. در حالی که در طحال INDO و L-Arg باعث افزایش معنی دار میزان NO شده است. در گروه ۶ در طحال ترکیب درمانی توام موجب افزایش NO نسبت به گروه های کنترل مربوطه شده است.

داروی INDO در طحال (شکل ۵) به شکل معنی داری ($P < 0.05$) باعث افزایش میزان NO شده است. که نشان دهنده تاثیر مثبت این دارو در درمان عفونت با L. major است. در حالی که L-Arg در کبد بدون تغییر در میزان NO (شکل ۴)، ولی در طحال باعث افزایش معنی داری NO با ($P < 0.05$) می باشد. که نشان دهنده تاثیر مثبت این دارو در درمان از طریق افزایش میزان NO می باشد.

بررسی اثر L-Arg از نظر آزاد کنندگی نایتریک اکساید (NO)
در مقایسه دو گروه آزمون و شاهد از نظر سطح NO سرم، به عنوان مهم ترین واسطه سیستم ایمنی در حذف انگل L. major، انتظار داریم که L-Arg به سبب القا کنندگی NO اگزوژنوس در گروه آزمون موجب افزایش میزان NO در مقایسه با موش های آلوده در گروه شاهد گردد.

در بررسی سرم پس از درمان با L-Arg (شکل ۳)، در سطح NO تغییر معنی داری مشاهده نگردیده است. این مطلب می تواند بیانگر کاهش سیستمیک تولید و القای NO توسط ماکروفاژها می باشد که به دلایل مختلف صورت می گیرد یکی از دلایل سرکوب پروسه تولید NO توسط مکانیسم های انگل لیشمانیا می باشد که انگل توسط سیستم پس خوری تولید NO را قطع یا ضعیف می کند که بنا به افزایش تعداد ماکروفاژهای آلوده و متلاشی شدن آنها عملاً تعداد زیادی از سلول های تولید کننده NO از پروسه سیستم ایمنی حذف می شوند و با توجه به اینکه در کبد و طحال کمتر است بنابراین ماکروفاژها نقش بیشتری را در افزایش یا کاهش NO دارند. علاوه

(شاهد) در مقایسه با موش های سالم شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism و آزمون Student's t-test انجام گرفت.

نتایج و بحث

در بررسی اسپلنومگالی کاهش معنی دار ($P < 0.001$) بین گروه های شاهد و آزمون آلوده به لیشمانیا ماژور (شکل ۱) نشان دهنده آن است که ایندومتاسین در این غلظت، تاثیر پاتوفیزیولوژیک معنی داری بر طحال موش های گروه آزمون در مقایسه با گروه شاهد داشته است. این امر می تواند نشانگر تأثیر ضد لیشمانیایی بسزا و مشخص ایندومتاسین در درمان بیماری و بازگشت به وضعیت نرمال که نشان دهنده عوارض جانبی کم، و مهار انگل توسط این دارو بوده است. و از این نظر موجب کاهش اسپلنومگالی گردیده است. و نتیجه ای که ارائه شده است با کنترل گروه ۴ (آب مقطر بعنوان حلال دارویی به آنها داده شده است) تقریباً یکسان می باشد.

بررسی اثر ضد لیشمانیایی L-Arg و INDO

با در نظر گرفتن این موضوع، مشاهده شد که در گروه ۳ ایندومتاسین پس از ۲ هفته درمان سبب بیشترین کاهش قطر زخم ناشی از L. major در موش های مستعد شد. این امر می تواند نشانگر تأثیر مثبت ایندومتاسین در مهار پروستاگلاندین، و در درمان بیماری و بازگشت به وضعیت نرمال باشد. ولی احتمالاً تاثیر NO به صورت نرمال می باشد. (شکل ۲)

در این مطالعه ما از موش های Inbred (همخون) Balb/c استفاده نموده ایم که عدم تناقض در مستعد بودن به لیشمانیا و فنوتیپ غیر خود محدود شونده آنها در مقالات متعدد به خوبی نشان داده شده است (۸، ۱۸). سیستم Th_2 در غیاب Th_1 مسئول حساسیت سیستم ایمنی بوده و در موش های Balb/c مستعد سبب متاستاز انگل به درون بدن و در نهایت مرگ جاندار می شود. در حالی که در گونه های مقاوم شاهد ایمنی لیشمانیا طی یک پاسخ Th_1 عمده منجر به فعال شدن ماکروفاژها و حذف انگل درون سلول از طریق القا (NOS II) و تولید NO می شود (۲۰).

تغییرات مربوط به القای NO در بافت کبد با روش GMA حاکی از کاهش سطح این واسطه ایمنی در گروه های آزمون پس از درمان با INDO (شکل ۴) در مقایسه با گروه شاهد می باشد. اگرچه که

عفونت شود. پیش تیمار ماکروفاژها با ایندومتاسین عفونت را از طریق مهار PG کاهش می دهد. مکانیسم سمی برای ماکروفاژها تشکیل NO را مهار می کنند. NO تولید شده در ماکروفاژها از طریق PG آزاد شده مهار می شود (۲۵).

استفاده از ممانعت INDO موجب کاهش مختصر تولید PG در گروه ۳ شده است (شکل ۶). ولی این کاهش به شکل معنی دار نبوده است. و احتمالاً از دلایل عمده آن پایین بودن غلظت موثر، استفاده از روش خوراکی به جای روش تزریقی و بدمزه شدن آب خوراکی در اثر افزودن INDO که موجب کاهش استفاده از آب در حیوانات مورد مطالعه شده است. که به نظر می رسد به کارگیری روش های دیگر تجویز دارو شبیه استفاده از روش های تزریق می تواند موجب کاهش خطای این مطالعه گردد. و همچنین تاثیر دارو سریع السیر و حداکثر تا ۳-۴ ساعت بعد از تجویز دارو می باشد. این نتایج نشانگر آن است که چون در موش های مستعد Balb/c ما بعد دو هفته درمان با ایندومتاسین موش ها را کشته و سرم آنها را جدا کردیم. بنابراین در این مدت زمان PGE_۲ سرم می تواند متابولیزه شود.

باتوجه به مهار PG توسط ایندومتاسین در روند درمان بیماری و ایجاد شرایطی مشابه با سیستم ایمنی در فنوتیپ مقاوم، این افزایش سطح PG سرم با مقاومت حیوان حساس مورد آزمایش نسبت به L. major متناسب بوده است.

بر NO تولید شده توسط ماکروفاژها، گونه های لیشمانیا خودشان نیز قادر به تولید NO هستند (۲۲، ۲۱). به نظر می رسد که انگل دارای مکانیسم های ذاتی برای مقاومت نسبت به NO به منظور ممانعت توکسیسیتی از NO اندوزن هستند (۲۳). مطالعات نشان داده که آنزیم های سطح آماسیگوت از تولید NO جلوگیری و فعالیت ضدلیشمانیایی را کاهش می دهند (۲۴)، در حالی که INDO (شکل ۳) که با بهبود بیماری همراه بوده است، سطح NO در سرم را در گروه آزمون افزایش داده است. در نمونه های سرم ترکیب دو داروی INDO و L-Arg باعث کاهش معنی داری ($P < 0.05$) در میزان NO شده است. (شکل ۳)

ترکیب دارویی توام INDO و L-Arg در گروه ۶ موجب مهار PG و NO گشته است. و این نشان دهنده این است که بکارگیری INDO که برای مهار PG بکار می رود موجب کاهش PG و تاثیر گذاری در مسیر (COX) که باعث پس خوران منفی در مسیر تولید NO توسط ماکروفاژها و اسپلنوسیت ها می باشد.

بررسی اثر INDO بر میزان PG سرم خون

به منظور بررسی بیوشیمیایی دارو، تاثیر INDO بر PG در سرم مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییرات در متابولیسم PG که قسمتی از پاسخ ایمنی در موش های حساس است می تواند باعث بهبودی یا افزایش

References

- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005 Oct 29-Nov 4; 366 (9496): 1561-77. PubMed PMID: 16257344.
- Wanasen N, MacLeod CL, Ellies LG, Soong L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of Leishmania amazonensis amastigotes in macrophages. Infect Immun 2007 Jun; 75 (6): 2802-10. PubMed PMID: 17387163. Pubmed Central PMCID: 1932894.
- White JM, Salisbury JR, Jones J, Higgins EM, Vega-Lopez F. Cutaneous leishmaniasis: three children with Leishmania major successfully treated with itraconazole. Pediatr Dermatol 2006 Jan-Feb; 23 (1): 78-80. PubMed PMID: 16445420.
- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 2006 Mar; 123 (3): 311-30. PubMed PMID: 16778313.
- Bradley DJ. Letter: Genetic control of natural resistance to Leishmania donovani. Nature 1974 Jul 26; 250 (464): 353-4. PubMed PMID: 4852791.
- Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to Leishmania major. Annu Rev Immunol 1995; 13: 151-77. PubMed PMID: 7612219.
- Soares M, David JR, Titus RG. An in vitro model for infection with Leishmania major that mimics the immune response in mice. Infect Immun 1997; 65 (7): 2837-45.
- Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of Leishmania major in C57BL/6 mice. J Immunol 2005 Mar 1; 174 (5): 2934-41. PubMed PMID: 15728505.
- Nameda S, Saito M, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. Effect of nitric oxide on beta-glucan/indomethacin-induced septic shock. Biol Pharm Bull 2005 Jul; 28 (7): 1254-8. PubMed PMID: 15997109.
- Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of Leishmania major infection in



- mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J Immunol* 1999 Jan 15; 162 (2): 974-9. PubMed PMID: 9916722.
- 11- Konger RL, Scott GA, Landt Y, Ladenson JH, Pentland AP. Loss of the EP2 prostaglandin E2 receptor in immortalized human keratinocytes results in increased invasiveness and decreased paxillin expression. *Am J Pathol* 2002 Dec; 161 (6): 2065-78. PubMed PMID: 12466123. Pubmed Central PMCID: 1850902.
 - 12- Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. 9th ed. New York ; London: Lange Medical Books/McGraw Hill; 2004.
 - 13- Khalili M, Narengkar J. The Role of Nitric Oxide and Prostaglandins in the Effect of Adenosine on Contractility, Heart Rate and Coronary Blood Flow in Guinea Pig Isolated Heart. *Iranian Biomedical Journal* 2005; 9 (4): 177-80. [Persian]
 - 14- Lesho EP, Wortmann G, Neafie R, Aronson N. Nonhealing skin lesions in a sailor and a journalist returning from Iraq. *Cleve Clin J Med* 2005 Feb; 72 (2): 93-4, 6, 8-9 passim. PubMed PMID: 15757166.
 - 15- Mittal J, Dogra N, Vohra H, Majumdar S. Effects of prostaglandin E2 and nitric oxide inhibitors on the expression of interleukin-10, interleukin-12 and MHC class-II molecules in Mycobacterium microti-infected and interferon-gamma-treated mouse peritoneal macrophages. *Folia Microbiol (Praha)* 2001; 46 (3): 259-64. PubMed PMID: 11702410.
 - 16- Nahrevanian H, Farahmand M, Aghighi Z, Assmar M, Amirkhani A. Pharmacological evaluation of anti-leishmanial activity by in vivo nitric oxide modulation in Balb/c mice infected with Leishmania major MRHO/IR/75/ER: an Iranian strain of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 2007 Jul; 116 (3): 233-40. PubMed PMID: 17335813.
 - 17- Lonardoni MV, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. *Infect Immun* 2000 Nov; 68 (11): 6355-61. PubMed PMID: 11035745. Pubmed Central PMCID: 97719.
 - 18- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* 2004 Jun; 119 (6): 238-58. PubMed PMID: 15243162.
 - 19- Holzmuller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, et al. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in Leishmania amazonensis amastigotes. *Infect Immun* 2002 Jul; 70 (7): 3727-35. PubMed PMID: 12065515. Pubmed Central PMCID: 128075.
 - 20- Basu NK, Kole L, Ghosh A, Das PK. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, Leishmania donovani. *FEMS Microbiol Lett* 1997 Nov 1; 156 (1): 43-7. PubMed PMID: 9368359.
 - 21- Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJ, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, et al. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in Leishmania amazonensis axenic amastigotes. *Arch Med Res* 2006 Apr; 37 (3): 328-33. PubMed PMID: 16513480.
 - 22- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, et al. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 7. PubMed PMID: 17316450. Pubmed Central PMCID: 1810296.
 - 23- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994 Sep 23; 78 (6): 915-8. PubMed PMID: 7522969.
 - 24- Griffon B, Cillard J, Chevanne M, Morel I, Cillard P, Sergeant O. Macrophage-induced inhibition of nitric oxide production in primary rat hepatocyte cultures via prostaglandin E2 release. *Hepatology* 1998 Nov; 28 (5): 1300-8. PubMed PMID: 9794915.

Application of L-Arginine as nitric oxide inducer and Indomethacin as prostaglandin inhibitor in Balb/c mice infected with *Leishmania major* MRHO/IR/75/ER

*Ghasemi F¹, Nahrevanian H²

Received: 25 Sep 2012

Accepted: 5 Dec 2012

Abstract

Background: Leishmaniasis is one of the health problems in. This study is designed to inhibit PG production by Indomethacin and induce NO by L- Arginine precursor in L. major infected Balb/c mice.

Materials and methods: This was an experimental study. Animals, Male inbred Balb/c mice were used in this study. The total number of animals used in this experiment was 48 Balb/c mice, divided into 6 groups (n =8 mice/group) including Group 1 (naive), Group 2 (L. major + 0.4% Ethanol), Group 3 (L. major + Indomethacin), Group 4 (L. major + DW), Group 5 (L. major + L- Arginine) and Group 6 (L. major + Indomethacin + L- Arginine). In addition to serum, liver and spleen suspensions were investigated for NO induction by using Griess microassay. The data was analyzed by Analysis of Variances (ANOVA) and Student's t-test using Graph Pad Prism Software.

Results: The results indicated that production of NO was inhibited in infected Balb/c mice by L. major as compared with naive animals (Group 1). INDO as inhibitor PG (Group 2) showed their ability to elevate RNI levels in infect animals. INDO showed anti-leishmanial activity, as these compounds reduced the lesion sizes (P<0.001). INDO as inhibitor PG (Group 3) showed ability to decrease PG levels in infect animals.

Conclusion: Our data may indicate a possible role for L-Arg and INDO as novel drug targets for the treatment of cutaneous leishmaniasis in mouse model.

Keywords: *Leishmania major*, Nitric Oxide, Indomethacin, L-Arginine

1- (*Corresponding Author) Researcher, AJA University of Medical Science, Department of Biochemistry, Tehran, Iran
Tel: E-mail: elhamgha_2007@yahoo.com

2- Resercher, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran