اثر ضد قارچی و تداخلی کمپلکس‌های آزاد کننده نیتریک اکساید و داروهای ضدقارچی متداول بر گونه‌های کاندیدا و کریپتوکوکوس نئوفورمنس

*دکتر مهربان فلاحتی I
دکتر محمد شعبانی II
مریم میرمحمدعلی رودکی III
دکتر فرشته جهانبانی IV
کامران پوشنگ باقری V

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکساید(Nitric oxide=NO)، مولکولی کوچک و لیپوفیل با نقشهای متعدد و گسترده در سیستم‌های بیولوژیک بدن می‌باشد که فعالیت ضد توموری و ضد میکروبی از خود نشان می‌دهد. تحریک ماکروفاژها توسط میکروارگانیسم‌های گوناگون منجر به تولید مقدار زیادی NO می‌شود که خاصیت سمی داشته و نهایتاً موجب مرگ میکروارگانیسم می‌شود. مکانیسم‌های وابسته به NO نقش کلیدی در دفاع میزبان علیه عفونت‌های قارچی ایفاء می‌کنند. در عفونت‌های کاندیدایی نیز NO مهم‌ترین راه کشتن کاندیدا آلبیکنس توسط پلی‌مورفونوکلئرها می‌باشد. هدف این بررسی، مطالعه اثر ضدقارچی و تداخلی کمپلکس‌های آزاد کننده NO و داروهای ضدقارچی بر گونه‌های کاندیدا و کریپتوکوکوس نئوفورمنس می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع تجربی است که پتانسیل ضد قارچی دو کمپلکس آزاد کننده NO را روی چند گونه کاندیدا و کریپتوکوکوس نئوفورمنس به تنهایی و در همراهی با داروهای کتوکونازول و آمفوتریسین B مورد بررسی قرار می‌دهد. تعیین کمترین غلظت بازدارندگی رشد به روش Micro dilution broth و مطابق با استانداردهای NCCLS(National committie of clinical laboratory standards) انجام گرفته است و در آن کمترین غلظت بازدارندگی از رشد(Minimal inhibitory concentration=MIC) و کمترین غلظت کشندگی قارچ(Minimal fungucidal concentration =MFC) دو کمپلکس آزاد کننده NO [DPTA/NO(DipropylenaTriamine/Nitricoxide) و DEA/NO(Diethylamine nitric oxide)] به تنهایی و همراه با کتوکونازول و آمفوتریسین B برای کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا و کریپتوکوکوس نئوفورمنس تعیین گردید.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان می‌دهد که کمپلکس DPTA/NO، دارای فعالیت ضد کاندیدایی و ضد کریپتوکوکی در تمام گونه‌های تحت بررسی می‌باشد. همچنین استفاده توأم از کمپلکس DPTA/NO در مورد گونه‌های کاندیدا گلابراتا(II) و کاندیدا تروپیکالیس، اثر سینرژیسم(Fractional inhibitory concentration index=FIX<۰/۵) و در مورد کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا گلابراتا(I)، اثر additive(۰/۵<FIX<۱) نشان می‌دهد. استفاده توأم DPTA/NO و آمفوتریسین B نیز بر ضد کریپتوکوکوس نئوفورمنس، اثر سینرژیسم(FIX<۰/۵) را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: کمپلکس‌های آزاد کننده NO، اثرات ضد کاندیدایی و ضد کریپتوکوکی داشتند و با داروهای ضد قارچی تداخل اثر به صور مختلف و وابسته به گونه قارچ نشان دادند که در آینده ممکن است به عنوان یک راه درمانی برای درمان عفونت‌های قارچی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – نیتریک اکساید(NO) ۲ – کمپلکس آزاد کننده NO ۳ – ضد قارچ ۴ – کاندیدا آلبیکنس ۵ – گونه‌های کاندیدا

تاریخ دریافت: ۸۴/۴/۱۵، تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۹

مقدمه

نیتریک اکساید(NO)، مولکول کوچک و لیپوفیلی است که در سیستم‌های بیولوژیک دارای نقشهای گسترده متنوعی می‌باشد[۱و ۲]، به طور مثال به عنوان گشاد کننده عروق، جلوگیری کننده از تجمع پلاکت‌ها، عامل گشادی برونش‌ها و تنظیم مسیرهای هوایی، تنظیم عملکرد کلیه و relaxation معده عمل می‌نماید.[۳و ٤] همچنین در سیستم ایمنی، فعالیت

I) استادیار گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز علوم پایه، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).
II) استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، مرکز علوم پایه، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران.
III) کارشناس ارشد قارچ‌شناسی.
IV) دکترای فارماکولوژی.
V) دانشجوی دکترای میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

www.SID.ir

ضد تومـوری و ضـد میکروبـی از خـود نـشان مـی‌دهـد[۵و ۶]، بـه طـوری کـه تحریـک ماکروفاژهـا توسـط میکروارگانیسم‌هـای مختلـف نظیـر بـاکتری‌هـا، ویـروس‌هـا، انگل‌هـا و قـارچ‌هـا منجـر بـه تولیـد مقـدار زیـادی NO می‌شود که خاصیت سمی(توکسیسیتی) داشـته و در نهایـت موجب مرگ میکروارگانیسم‌هـای پـاتوژن مـی‌شـود.[۷-۹] بـه همین خاطر مکانیسم‌های وابسـته بـه NO، نقـش کلیـدی در دفـاع میزبـان علیـه عفونـت‌هـای قارچـی ایفـا می‌کنند.[۱۰و ۱۱]

در عفونت‌های کاندیدایـی نیـز تحقیقـات نشان مـی‌دهـد که مکانیسم‌هـای وابسته بـه NO، مهـم‌تریـن راه کـشتن کاندیـدا آلبیکـنس توسـط پلـی‌مورفونوکلئرهـا (Polymorphonuclear=PMN) می‌باشد.[۱۲-۱۴] همچنین در مکانیسم‌های دفاعی بدن علیه کریپتوکوکوس نئوفورمنس، هر چند وجود کپسول پلی‌ساکارید در این مخمر به صورت یک نقـاب عمـل نمـوده و سـیگنالهای لازم بـرای ترشـح Tumour necrosis)TNFα ،(Interferone-gamma)INFδ factor α) کـه سـبب القـاء ژن iNOS(inducible Nitric Oxide Syntetase) و تولید NO می‌شوند را کاهش می‌دهد، ولی آمفوتریسین B که داروی متداول در درمان عفونت‌هـای کریپتوکوکی اسـت بـا القـاء INFδ، سـبب القـاء ژن iNOS و تولیـد NO بـه مقـدار زیـاد شـده و اثـر ضـد کریپتوکـوکی ماکروفاژها را افزایش می‌دهـد.[۱۵و ۱۶] هـر چنـد مطالـب فـوق اثـرات ضـد کاندیـدایی و ضـد کریپتوکـوکی NO را نـشان می‌دهد ولی به علت ناپایـداری NO و محـدودیت حلالیـت آن در محیط‌های آبی، کاربرد مـستقیم آن بـه عنـوان یـک عامـل ضد پاتوژن دچار اشکال شده بود.[۱۷] تولید گروه جدیـدی از مواد به نام diazonium diolate یـا NoNo ates کـه No را به طور خودبخودی در پاسخ به تغییرات PH محیط و بـدون فعال شدن از طریق واکنش‌های Redox و یا انتقـال الکتـرون آزاد می‌کنند، راه را برای مطالعه بیش‌تر دربـاره اثـرات ضـد قارچی NO باز کرد.[۱۸-۲۰]

بررسـی حاضـر پتانـسیل ضـد قـارچی دو کمـپلکس آزاد کننـده NO را بـر روی چنـد گونـه کاندیـدا و یـک گونـه کریپتوکوکـوس نئوفـورمنس بـه تنهـایی و در همراهـی بـا داروهای کتوکونازول و آمفوتریسین B مورد بررسـی قـرار می‌دهد.

روش بررسی

گونـه‌هـای کاندیـدا شـامل کاندیـدا آلبیکـنس (Persian type of culture collection)PTCC(5027) تهیه شده از سازمان پـژوهش‌هـای علمـی و صـنعتی ایـران، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس، یک نمونه کاندیدا گلابراتای حساس، یـک نمونـه کاندیـدا گلابراتـای مقـاوم بـه کتوکنازول جدا شده از بیماران و یک نمونـه کریپتوکوکـوس نئوفورمنس مـی‌باشـد. داروهـای ضـد قـارچی شـامل پـودر کتوکونازول(03-02) Bath No 50 اهـدایی کارخانـه بهـوزان رشـت، آمفوتریـسین B($C_{47}H_{73}$-A_{4888}) محـصول شـرکت سیگما و کمپلکس‌های آزاد کننده NO شامل DPTA/NO بـا فرمول $C_6H_{17}N_5O_2$ و وزن مولکولی ۱۹/۱۲ دالتون بـا نیمـه عمر ۵ سـاعت در ۲۵ درجـه سـانتی‌گراد و ۳ سـاعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کـه محلـول در آب و متـانول مـی‌باشـد و DEA/NO با فرمول شیمیایی $C_4H_{10}N_3O_2$ و وزن مولکولی ۳۲/۲ و ۱۳۲/۱ دالتون بـا نیمـه عمـر ۱۶ دقیقـه در ۲۵ درجـه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد که محلـول در آب و متانول می‌باشد، است.

بررسـی حاضـر یـک مطالعـه تجربـی اسـت. آزمـایش در میکروپلیـت‌هـای ۹۶ خانـه‌ای و مطـابق بـا اسـتانداردهای NCCLS(National committie of clinical laboratory standards) انجام گرفته است. محتویـات هـر چاهـک شـامل ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری تهیه شده در محیط RPMI 1640 در بردارنـده 10^4 سـلول در هـر میلـی‌لیتـر از کشت ۲۴-۱۸ ساعته گونه‌های کاندیدا و ۴۸-۲۴ ساعته گونـه کریپتوکوکـوس نئوفـورمنس و ۱۰۰ میکرولیتـر از رقتهـای سـریال دارویـی شـامل کتوکونـازول(۵-۰/۰۱ میکروگـرم در میلی‌لیتر)، آمفوتریسین B(۶۴-۰/۰۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کمـپلکس‌هـای آزاد کننـده No(۵-۰/۰۱ میکروگـرم در میلی‌لیتـر) بـود و حجـم نهـایی هـر چاهـک ۲۰۰ میکرولیتـر

Archive of SID
www.SID.ir

بود. همچنین از کنترل(+)، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی و کنترل(-)، حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI نیز برای کنترل مراحل آزمایش استفاده گردید. سپس میکروپلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در سیکرانکوباتو قرار داده شدند و کمترین رقتی که هیچ گونه رشدی در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MFC یا حداقل غلظت قارچکشی بعد از یکنواخت کردن محتویات هر چاهک، ۲ میکرولیتر از آن را برداشته و بر روی محیط جامد برده و به صورت خطی کشت داده شد و اولین رقتی که هیچ کلونی قارچی در آن مشاهده نشد، به عنوان MFC در نظر گرفته شد، همچنین تعداد کلونی‌های رشد کرده در هر رقت از کمپلکس‌های NO به تنهایی و در استفاده همزمان با داروها نیز شمارش گردید.[۲٤-۲۱]

اثر ناشی از استفاده همزمان هر یک از کمپلکس‌های NO و داروی کتوکونازول و آمفوتریسین B نیز بر روی گونه‌های کاندیدا و کریپتوکوکوس نئوفورمنس بررسی گردید و مقدار FIX نیز با استفاده از فرمول زیر و براساس تغییر آن به شرح زیر، تداخل اثر هر یک از کمپلکس‌ها با هر یک از داروها اعلام گردید.

$$FIX=\frac{\text{MIC of NO donors in Combination}}{\text{MIC of NO donors alone}}+\frac{\text{MIC of Drugs in Combination}}{\text{MIC of Drugs alone}}$$

FIX<۰/۵=synergistic effect

۰/۵<FIX<۱ additive effect

۱<FIX<٤ indifferent

FIX>٤antagonistic effect

FIX=fractional inhibitory concentration index

یافته‌ها

نتایج این بررسی به شرح زیر می‌باشد:

MIC کمپلکس DPTA/NO به تنهایی برای کاندیدا آلبیکنس(PTCC(5027 برابر ۰/٦۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۱۵٦ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا تروپیکالیس ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا(۱)[۱] ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا(۲)[۲] ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کریپتوکوکوزیس نئوفورمنس ۰/۰۱۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در جدول شماره ۱، خلاصه و منعکس شده است.

جدول شماره ۱- MIC و MFC کمپلکس DPTA/NO بر روی گونه‌های کاندیدا و مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس

گونه‌های قارچی	MIC کمپلکس DPTA/NO (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MFC کمپلکس DPTA/NO (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
کاندیدا آلبیکنس PTCC(5027)	۰/٦۲۵	۲/۵
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۱۵٦	۵
کاندیدا تروپیکالیس	۱/۲۵	۲/۵
کاندیدا گلابراتا(۱)	۱/۲۵	۵
کاندیدا گلابراتا(۲)	۲/۵	۵
کریپتوکوکوزیس نئوفورمنس	۰/۰۱۹	۰/۰۳۹

کمترین غلظت مهار کنندگی رشد داروی کتوکونازول برای کاندیدا آلبیکنس(PTCC(5027 ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاندیدا تروپیکالیس ۱٦ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا(۱)[۱] ٤ میکروگرم در میلی‌لیتر و کاندیدا گلابراتا(۲)[۲] ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و MIC داروی آمفوتریسین B برای کریپتوکوکوس نئوفورمنس ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که خلاصه آن در جدول شماره ۲ موجود می‌باشد.

جدول شماره ۲- MIC داروهای کتوکونازول و آمفوتریسین B بر روی گونه‌های کاندیدا و کریپتوکوکوس نئوفورمنس

گونه‌های قارچی	MIC کتوکونازول و آمفوتریسین B (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
کاندیدا آلبیکنس(PTCC(5027	۱
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۵
کاندیدا تروپیکالیس	۱٦
کاندیدا گلابراتا(۱)	٤
کاندیدا گلابراتا(۲)	۳۲
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	۱

Archive of SID
www.SID.ir

MIC کمپلکس DPTA/NO در مجاورت با کتوکونازول برای کاندیدا آلبیکنس(PTCC(5027 ۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۰۷۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا تروپیکالیس ۰/۰۳۹ میلی گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا[۱] ۰/٦۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر، و کاندیدا گلابراتا[۲] ۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و MIC(PTCC(5027 در مجاورت آمفوتریسین B برای کریپتوکوکوس نئوفورمنس ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. همچنین MIC کتوکونازول در مجاورت با کمپلکس DPTA/NO برای کاندیدا آلبیکنس(PTCC(5027 ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاندیدا تروپیکالیس ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا[۱] ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و کاندیدا گلابراتا[۲] ٤ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و MIC آمفوتریسین B در مجاورت با کمپلکس DPTA/NO برای کریپتوکوکوس نئوفورمنس ۰/۰۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج فوق در جدول شماره ۳ ذکر گردیده است.

در این بررسی همچنین تعداد کلونی‌های قارچی در هر رقت از کمپلکس DPTA/NO به تنهایی و در استفاده همزمان (کتوکونازول + DPTA/NO) برای گونه‌های کاندیدا و (آمفوتریسین B + DPTA/NO) برای کریپتوکوکوس نئوفورمنس شمارش گردید که در جدول شماره ٤، ٥و ٦ موجود می‌باشد. مقادیر FIX بدست آمده برای گونه‌های تحت بررسی در جدول شماره ۷ منعکس می‌باشد.

جدول شماره ۳- MIC و MFC کمپلکس DPTA/NO و کتوکونازول و آمفوتریسین B در استفاده همزمان بر روی گونه‌های قارچی

گونه‌های قارچی	MIC کمپلکس DPTA/NO در همراهی کتوکونازول و آمفوتریسین B (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MFC	MFC	MIC کتوکونازول و آمفوتریسین B در همراهی کمپلکس DPTA/NO (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
کاندیدا آلبیکنس(PTCC(5027	۰/۳۱۲	۱/۲۵	۲	۰/۵
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۰۷۸	۱/۲۵	۲	۰/۱۲۵
کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۳۹	۱/۲۵	۱٦	۰/۵
کاندیدا گلابراتا[۱]	۰/٦۲۵	۱/۲۵	۱٦	۲
کاندیدا گلابراتا[۲]	۰/۳۱۲	۲/۵	۳۲	٤
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱

جدول شماره ۴- تعداد کلونی‌های شمارش شده گونه‌های کاندیدا در رقتهای مختلف کمپلکس DPTA/NO

رقتهای سریال کمپلکس DPTA/NO / گونه‌های قارچی	۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/٦۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۱۵٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
کاندیدا آلبیکنس(PTCC(5027	۰	۰	۳۰۰	۷۰۰	۲۷۰۰	غیرقابل شمارش	"	"	"
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۲۰۰	۲۰۰۰	۷۱۰۰	۱۵٦۰۰	۱۵۱۰۰	غیرقابل شمارش	"	"	"
کاندیدا تروپیکالیس	۰	۰	٤۰۰	۱۵۰۰	۱۲۳۰۰	۵۱۰۰۰	غیرقابل شمارش	"	"
کاندیدا گلابراتا[۱]	۰	۲۰۰	۱۲۰۰	۲۵۳۰۰	غیرقابل شمارش	"	"	"	"
کاندیدا گلابراتا[۲]	۰	۸۰۰	۵۳۰۰	۲۸٤۰۰	غیرقابل شمارش	"	"	"	"

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۵- تعداد کلونی‌های شمارش شده گونه‌های کاندیدا در رقتهای مختلف DPTA/NO + کتوکونازول

رقتهای سریال کمپلکس DPTA/NO / گونه‌های قارچی	۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
کاندیدا آلبیکنس(5027)PTCC	۰	۲۰۰	۷۰۰	۱۳۰۰	۳۰۰۰	غیرقابل شمارش	"	"
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰	۰	۱۶۰۰	۲۵۰۰	۱۰۳۰۰	غیرقابل شمارش	"	"
کاندیدا تروپیکالیس	۰	۰	۳۰۰	۴۰۰	۱۲۰۰	۲۱۰۰	۱۱۶۰۰	۱۳۵۰
کاندیدا گلابراتا[۱]	۰	۰	۳۶۰۰	۹۴۰۰	۲۶۹۰۰	غیرقابل شمارش	"	"
کاندیدا گلابراتا[۲]	۰	۳۶۰۰	۱۶۵۰۰	۲۷۳۰۰	۲۸۵۰۰	۳۱۸۰۰	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش

جدول شماره ۶- تعداد کلونی‌های شمارش شده کریپتوکوکوس نئوفورمنس در رقتهای مختلف کمپلکس DPTA/NO

رقتهای سریال کمپلکس DPTA/NO / گونه قارچی	۵-۰/۰۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۰۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۰۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۰۰۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
کریپتوکوکوس نئوفورمنس: تعداد کلونی در رقتهای کمپلکس DPTA/NO به تنهایی	۰	۱۵۰	۷۹۰۰	۱۲۵۰	۲۶۴۰	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش	غیرقابل شمارش
کریپتوکوکوس نئوفورمنس: تعداد کلونی در رقتهای کمپلکس (آمفوتریسین B + DPTA/NO)	۰	۰	۰	۰	۲۰۰	۸۰۰	۲۰۰۰	۳۸۰۰	۵۳۰۰

جدول شماره ۷- مقدار FIX برای گونه‌های قارچی تحت بررسی

گونه‌های قارچی	مقدار FIX(میکروگرم در میلی‌لیتر)
کاندیدا آلبیکنس(5027)PTCC	۰/۹۹
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۷۵
کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۶
کاندیدا گلابراتا[۱]	۱
کاندیدا گلابراتا[۲]	۰/۲۴
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	$۸/۲\times۱۰^{-۲}$

در این بررسی همچنین اثر کمپلکس DPTA/NO بر روی گونه‌های کاندیدا و کریپتوکوکوس نئوفورمنس بررسی شد ولی به دلیل نیمه عمر کوتاه آن در شرایط موجود برای آزمایش، هیچ گونه اثر ضد قارچی مشاهده نگردید.

بحث

NO، مولکول کوچکی است که به دلیل چربی دوست بودن به راحتی از غشاء سلولی عبور می‌کند و کمتر میکروارگانیسمی می‌تواند از ورود آن به داخل سلول جلوگیری کند.[۲۵] امروزه اطلاعات وسیعی در مورد نقش فیزیولوژیک و سیتوتوکسیک NO وجود دارد.[۲۶]

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کمپلکس DPTA/NO دارای فعالیت ضد کاندیدایی و ضد کریپتوکوکی در مورد تمام گونه‌های تحت بررسی می‌باشد. در بین این گونه‌ها، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کریپتوکوکوس نئوفورمنس نسبت به سایرین از حساسیت بیش‌تری نسبت به NO برخوردار بوده و کاندیدا گلابراتای[۲] جدا شده از بیمار و مقاوم به درمان با دارو، کمترین میزان حساسیت را نسب به مولکول NO دارد. همچنین استفاده توام از کمپلکس

Archive of SID
www.SID.ir

DPTA/NO و کتوکونازول در مورد گونه‌های کاندیدا گلابراتا[۲] و کاندیدا تروپیکالیس، اثر synergism(FIX<۰/۵) و در مورد کاندیدا آلبیکنس(PTCC 5027) و کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا گلابراتا[۱]، اثر additive (۰/۵<FIX<۱) را نشان می‌دهد. استفاده توام از DPTA/NO و آمفوتریسین B در مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس نیز اثر synergism(FIX<۰/۵) را نشان می‌دهد. در استفاده همزمان NO و کتوکونازول در مورد سوش کاندیدا گلابراتا[۲] که از بیماری با واژینیت مزمن عود کننده بدست آمده و مقاوم به کتوکونازول بود، شاهد تغییر محسوس در MIC کتوکونازول بودیم، در حالی که در مورد کاندیدا گلابراتا[۱] که حساس به کتوکونازول است، این امر مشاهده نمی‌گردد و به نظر می‌رسد مولکول NO در از بین بردن عامل مقاومت به کتوکونازول در سوش مقاوم، به نحوی تاثیر داشته و از این رو در استفاده توام از NO و کتوکونازول، MIC سوش مقاوم به MIC سوش حساس نزدیک شده است.

همچنین مشاهدات اخیر نشان می‌دهد که حساسیت گونه‌های کاندیدا نسبت به کتوکونازول بسیار متنوع و متغیر است، در حالی که در مورد NO این امر مشاهده نشده و حساسیت گونه‌های کاندیدا نسبت به NO در یک محدوده مشخصی است و MIC آن از یک حد معینی، کمتر نمی‌شود و این امر نشان می‌دهد که NO دارای یک اثر آستانه‌ای بوده و مکانیسم اثر آن، متفاوت با مکانیسم اثر داروها می‌باشد که از جمله مکانیسم‌های اثر NO، غیر فعال سازی طیف وسیعی از آنزیم‌های سلولی، توقف در تنفس سلولی، تغییر در عملکرد پروتئین‌ها و یا پراکسید لیپیدها و یا ایجاد جهش و تغییرات در DNA سلول می‌باشد.[۵ و ۲۹-۲۶]

بررسی نتایج فوق نشان می‌دهد که کمپلکس‌های NO می‌توانند در آینده به عنوان یک راه درمانی جدید در درمان عفونت‌های کاندیدایی و کریپتوکوکی مورد استفاده قرار گیرند، اما این امر نیاز به تحقیقات و مطالعات بیش‌تری دارد، زیرا اولاً مقدار NO لازم برای کشتن قارچ‌ها در invitro بیش‌تر از مقدار فیزیولوژیکی NO در بدن است، زیرا در شرایط invitro، کوفاکتورها و سایر عوامل نیز وجود دارند که کمک کننده می‌باشند در نتیجه برای مصرف سیستمیک NO و بدست آوردن مقدار دقیق آن، باید بررسی‌های بیش‌تری صورت بگیرد. در مورد مصرف سیستمیک NO ابتدا باید بررسی نمود که آیا مصرف این ترکیبات آزاد کننده NO دارای اثرات توکسیک می‌باشد یا نه که بررسی‌های invitro نشان داده است که هر چند مصرف این ترکیبات تا مدتی از خاصیت تکثیر سلول می‌کاهد ولی قابلیت حیات سلول در بیش از ۹۵٪ موارد حفظ می‌شود که این بیانگر آن است که کمپلکس‌های NO، سیتوتوکسیک نیستند.[۳۰] در ضمن برای استفاده سیستمیک از این کمپلکس‌ها باید بتوان حق‌المقدور کمپلکس‌های فعال شده را مستقیماً به ارگانیسم هدف رساند که برای رفع این مشکل نیز بررسی‌هایی صورت گرفته است، از آن جمله اینکه کمپلکس‌های NO را به منوکلونال آنتی‌بادی‌های اختصاصی انتقال می‌دهند و NO به کمک آنتی‌بادی اختصاصی دقیقاً به محل عفونت قارچی یا باکتریایی می‌رسد و در آنجا آزاد شده و اثر خود را مستقیماً روی ارگان هدف می‌گذارد.

البته برای رسیدن به نتیجه قطعی در این زمینه مطالعات ادامه دارد[۳۱ و ۳۲]، اما بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که حداقل می‌توان از کمپلکس‌های NO به صورت موضعی استفاده نموده، اما برای مصرف سیستمیک آن به مطالعات بیش‌تری نیاز است. همچنین در این بررسی، اثر کمپلکس DEA/NO بر روی تمام گونه‌های قارچی فوق مورد بررسی قرار گرفت که به دلیل نیمه عمر کوتاه آن هیچ گونه اثر ضد قارچی مشاهده نگردید.

عدم دسترسی به سویه‌های مخمری استاندارد ATCC و نیز نیمه عمر کوتاه DEA/NO که در شرایط موجود اثرات آن قابل مشاهده نبود، از عوامل محدود کننده در این پژوهش بودند.

نتیجه‌گیری

کمپلکس‌های آزاد کننده NO، اثرات ضد قارچی قابل توجهی دارند و با داروهای ضد قارچی مختلف بکار رفته در

Archive of SID
www.SID.ir

این بررسی اثر تداخلی دارند که بسته به گونه‌های مورد بررسی، به صورت‌های مختلف می‌توانند باشند. این کمپلکس‌ها در آینده می‌توانند به عنوان یک راه درمانی جدید برای درمان عفونت‌های قارچی بکار روند که برای رسیدن به این هدف نیاز به تحقیقات بیش‌تر می‌باشد.

تقدیر و تشکر

در پایان از خانم اسلامی کارمند کتابخانه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران برای همکاری در تنظیم رفرانس‌ها و خانم آذانپور برای ماشین‌نویسی این مقاله سپاسگزاری می‌گردد.

فهرست منابع

1- Lancaster JR, Jack R. Nitric oxide in cells. American scientist 1994 May-June; 80: 248-59.

2- Madan G, Rao M. Physiological and clinical importance of nitric oxid. Indian J Med sci 1996 Sep; 50(9): 318-24.

3- Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide physiology, Pathology and clinical relevance. European Journal of clinical investigation 1991; 21: 361-74.

4- Sajeevchandran N, Addepalli S, Veeranjan EY. Nitric oxide: Concept, current perspective and Future therapeutic implication. Indian Journal of Pharmacology 1998; 30: 351-66.

5- De Groote MA, Fang FC. No inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. Clin Infect Dis 1995; 21(2): 162-5.

6- Farias Eisner, Chaudhuri RG, A Eeberhard, Fukuto JM. The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide/hydrogen peroxide and implications to cell resistance. J Biol chem 1996; 271: 6144-54.

7- James SL. Nitric oxide in parasitic infection. Inter Immuno pharmacology 2001; 1: 1457-62.

8- Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: A macrophage product responsible for sytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med 1997; 169: 1543-55.

9- Weller R, Price RJ, Ormerod AD, Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi. Candida and bacterial skin pathogen. J of Appled Microbiol 2001; 90(4): 648.

10- Kadeken N, Kawakami K, Saito A. Different susceptibilities of yeasts and canidia of penicilium marneffei to nitric oxide mediated fungicidal activity of murine macrophage. Clin Exp Immunol 1998; 112(2): 287-93.

11- Gonzales A, De Gregori W, Velez D, Restrrpo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophage against paracoccidioides brasiliensis. Infect Immunity 2000; 68(5): 2046-52.

12- Fierro IM, Barja fidalgo C, Cunha FQ, Ferreira SH. The involvement of nitric oxide in anti-candida albicans activity of rat neutrophils. Immunology 1996; 86(2): 295-300.

13- Rementeria A, Garcia Tobalina R, Sevilla MJ. Nitric oxide dependent killing of candida albicans by murine peritonea cells during an experimental infection. FEMS Immunol Med Microbiol 1995; 11(3): 157-62.

14- Torres AV, Carson JJ, Balish E. Peroxinitrite contributes to the candidacidal activity of Nitricoxide producing macrophage. Infec immunol 1996; 64(8): 3127-33.

15- Rossi GR, Cervi LA, Garcia MM, Chiapello LS, Sastre DA, Masih DT. Involvment of nitric oxide in protecting mechanism during experimental cryptococosis. Clin Immunol 1999 Feb; 90(2): 256-65.

16- M Tohyama, K kawakami, A Saito. Anti cryptococoal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide. Antimicrobial agent and chemotherapy 1996; 8(40): 1919-23.

17- Moncada SR, Palmer MJ, Higgs EA. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1997; 25: 647-78.

18- Harbie JA, Klos JR, Wink DA, Keffer LK. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamine. J Org chem 1993; 58: 1472-6.

19- Keefer LK, Nims RW, Davis KW, Wink DK. NoNo ates as nitric oxide donors convenient nitric oxide dosage form. Method enzymole 1996; 268: 281-93.

20- Maragos CM, Morely D, Wink DA, Dunams TM, Saavedra JE. Complexes of No with nucleophiles as agent for the controlled biological release of nitric oxide vasorelaxant effect. J Med chem 1991; 34: 3242-7.

21- Canton E, Perman J, Carrilb Munoz A, Onero A, Ubeda P, Viudes A, et al. Fluconazole susceptibilities of bloodstream candida sp isolates as determined by National committees for clinical laboratory standard, methods M27-A and two other methods. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2197-200.

Archive of SID

www.SID.ir

22- Mc Ethaney, Feser GE, Ravlli RE, Cihlar RL. Synergy of nitric oxide and Azoles against candida species invitro. Antimicrobial agent and chemotherapy 1998 Sep; 42(9): 2342-6.

23- Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination treatment of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 2005 Jan; 18(1): 163-94.

24- Shin S, Pyun MS. Anti-Candida effects of estragole in combinantion with ketoconazole or amphotericin B. Phytother Res 2004 Oct; 18(10): 827-30.

25- Cifone MG, Ulisse S, Santoni A. Natural killer cells and nitricoxide international. Immunol 2001; 1: 1513-24.

26- Knoweles RG, Moncada S. Nitric oxide synthesis in mammals. Biochemical Journal 1994; 298: 249-58.

27- Tamir S, DeRojas Walker T, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and genotoxicity by nitric oxide. Method enzymol 1996; 269: 230-43.

28- Jourd' heuill D, Kang D, Grisham MB. Interaction between superoxide and nitric oxide: implication in DNA damage and mutagenesis. Front Biosci 1997; 2: 189-96.

29- Ischiropoulos H, Gow A. Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. Toxicology 2005 Mar 15; 208(2): 299-303.

30- Mooradian DL, Hustell TC, Keefer LK. Nitric oxide donor molecules: effect of No release rat on vascular smooth muscles cell proliferation in vitro. J cardiovsc pharmacol 1995; 25: 674-8.

31- Savedra JE, Billiar TR, Willams DL. Targeting nitric oxide delivery in vitro. J Med chem 1997; 40: 1947-54.

32- Stevens DA, Kullberg BJ, Brummer E, Casadevall A, Netea MG, Sugar AM. Combined treatment: antifungal drugs with antibodies, cytokines or drugs. Med Mycol 2000; 38(1): 305-15.

Archive of SID

www.SID.ir

Antifungal and Interactive Effects of NO Donor Complexes and Common Antifungal Drugs on Candida Species and Cryptococcus Neoformans

***M. Falahati, PhD**[I] ***M. Shabani, PhD**[II] ***M. Mirmohammadali Roodaki, MS**[III]
***F. Jahanbani, PhD**[IV] ***K. Pooshang Bagheri, MS**[V]

Archive of SID

Abstract

Background & Aim: Nitric oxide(NO) is a molecule with expanded and numerous roles in biologic system of the body. It shows antitumor and antimicrobial activities. Stimulation of macrophages by different microorganisms leads to the production of a large amount of NO with toxic property that causes the death of microorganisms. Mechanisms related to NO perform an important role in host's defense against fungal infections. In candidial infections NO is regarded as the most important factor in killing candida albicans by polimorphonuclear cells.

Material & Method: This experimental study was designed to investigate antifungal potential of two NO donor complexes namely DPTA/NO(Dipropylenetriamine nitric oxide) and DEA/NO(Diethyleamine nitric oxide) per se and in combination with antifungal drugs such as ketoconazole and amphotricin B against candida albicans, candida parapsilosis, candida tropicalis, candida glabrata, and cryptococcus neoformans. In order to do so, we determined MIC(Minimum Inhibitory Concentration) and MFC(Minimum Fungicidal Concentration) of the above-mentioned complexes as per NCCLS(National Committee of Clinical Laboratory Standards) using microdilution broth method.

Results: The obtained findings showed that DPTA/NO complex per se exerted antifungal effects. In addition, this complex revealed synergic effects on C. tropicalis, C. glabrata II, and cryptococcus neoformans(FIX<0.5) and additive effects on C. albicans, C. parapsilosis, and C. glabrata I(0.5<FIX<1) in combination.

Conclusion: NO donor complexes indicated anticandidial and anticryptococcal effects and interacted with antifungal drugs differently, depending on the species of the fungi involved. Accordingly, they can be used as therapeutic agents in the treatment of fungal infections.

Key Words: **1) Nitric Oxide** **2) NO Donor Complexes** **3) Antifungus** **4) Candida Albicans** **5) Candida Species**

***I*)** *Assistant Professor of Medical Mycology. Faculty of Medicine. Center of Basic Sciences. Hemmat and Chamran Highway Intersection. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
***II*)** *Assistant Professor of Biochemistry. Faculty of Medicine. Center of Basic Sciences. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
***III*)** *MS in Medical Mycology.*
***IV*)** *PhD in Pharmacology.*
***V*)** *Doctoral Student of Microbiology. Isfahan University of Medical Sciences and Health Services. Isfahan, Iran.*

www.SID.ir