بررسی نانوداروی تربینافین Terbinafine در درمان درماتوفیتوزیس القاشده در خوکچه هندی و مقایسه آن با میزان فعالیت تربینافین موثر در داروی تجاری

مهشید لالوند[1]، جمال هاشمی هزاوه*[2]، منصور بیات[3]

[1] دانشجوی دکترای تخصصی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
[2] دانشیار دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[3] استاد دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۷/۱۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

چکیده

مقدمه: حیوانات منبع مهم کچلی برای انسان چه در جوامع شهری و چه در روستا محسوب می شوند به همین دلیل مسئله کنترل درماتوفیتوزیس در حیوانات از نظر بهداشت عمومی دارای اهمیت است. حضور پوسته های آلوده حیوانات در اماکن یک منبع بالقوه عفونت است. با توجه به شیوع بالای درماتوفیتوزیس و توجه به درمان سخت و طولانی در برخی فرم های این بیماری و عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای ضدقارچی، نیاز به جایگزین مناسب داروهای فعلی ضروری به نظر می‌رسد. دارویی که اثرات قوی و موثردر مهار قارچ و عوارض جانبی کمتری به همراه داشته باشد. اهمیت و نوآوری تحقیق حاضر، بررسی اثردرمانی داروی تربینافین*Terbinafine* برروی مدل حیوانی(خوکچه هندی) و تبدیل این دارو به ابعاد کوچک درحد نانو جهت افزایش اثرات ضد قارچی آن است که هم بتواند حساسیت را بالا برده و هم مقاومت به درمان را کاهش دهد.

مواد و روش ها: سوش استاندارد *ترایکوفایتون متاگروفیتس ATCC ۱۸۷۴۸* و ایزوله بالینی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرارگرفت. مدل حیوانی برای ایجاد کچلی،۳۰ عدد خوکچه هندی که در ۴ گروه تیمار تقسیم‌بندی گردید(کنترل مثبت،کنترل منفی، فرم معمول تربینافین ۱٪ و فرم نانو داروی تربینافین)،تلقیح در خوکچه هندی به روش تاگامی انجام گرفت. محل ایجاد ضایعه، روزانه از نظرعلائم بالینی به مدت ۲۰روز بررسی شد. درمان موضعی ۵ روز پس از آلوده سازی، هر ۱۲ ساعت یکبار تا ۴۰ روز پس از آلودگی ادامه یافت. درمان نانودارو توسط آب‌پاش طوری در موضع پاشیده می‌شد که علاوه بر سطح آلوده، یک حاشیه چند سانتی‌متری نیز از موهای سالم اطراف خیس شود.کرم تربینافین ۱٪ به شکلی روی ضایعه قرارداده که علاوه بر ایجاد یک لایه کامل و نازک، ۲ سانتی‌متر از حاشیه ضایعه را نیز پوشش دهد.

نتایج: در بررسی روی ناحیه درجات متوسطی ازضایعه(score average lesion) بود که در گروه فرم نانوداروی تربینافین تلفیقی، در روز آغازین درمان، عدد ۳ score را نشان داد(سرخی قابل ملاحظه به همراه پوسته بزرگ) و برای گروه فرم معمولی داروی تربینافین **Terbinafine** (گروه۴) عدد۴ را نشان داد. اولسر و اسکار به همراه مواردی که در درجه ۳ وجود دارند، روند کاهشی درجه ضایعات در گروه‌های درمانی نانودارو، در بین روزهای۱۰ تا ۱۵ اتفاق افتاد که با افزایش در ۵ روز بعدی همراه شده و با یک روند منطقی تا روز ۴۰ ادامه یافت، بطوری که در روز ۴۰ همگی گروه‌ها به جز کنترل مثبت score صفر داشتند. بررسی‌های آماری بین گروهی‌که فرم معمول تربینافین یک درصد و کنترل منفی، اختلاف آماری معنی داری را در همه روزها به جز روز ۳۵ و۴۰ نشان می‌دهند($p<0.05$). همین بررسی نشان داد که بین گروه نانوداروی تربینافین ۱٪ و کنترل مثبت به ترتیب از روز ۲۵ و۳۰ تا پایان درمان اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهدکه نانوداروها برای درمان درماتوفیتوزیس ناشی از *تریکوفایتون متاگروفایتیس* مناسب و از نظر تأثیر درمان با فرم معمول داروها شدت و سرعت بهبودی قابل قیاس‌تری دارند. سرعت بهبود فرم نانوداروها از داروی معمولی بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: ترایکوفایتون متاگروفایتون، نانودارو، تربینافین، خوکچه هندی

نویسنده مسئول:
*دانشیار دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۰۹۱۲۱۰۰۹۱۴۱

sjhashemi9141@yahoo.com

مقدمه

قارچ‌ها ارگانیسم‌های یوکاریوت هتروتروف بوده که برای رشد خود به ترکیبات آماده به عنوان کربن نیازمند هستند. دیواره سلولی قارچ ها حاوی پلیمرهای پلی ساکاریدی شامل کیتین، مانان، گلوکان، کیتوزان و بندرت سلولز می‌باشد. قارچ های جلدی به نسوج کراتین‌دار پوست، مو و ناخن حمله کرده و ضایعاتی ایجاد می‌نمایند. درماتوفیت‌ها می‌توانند از کراتین به عنوان منبع نیتروژن استفاده کنند و بخش های کراتینیزه پوست، مو و ناخن را مورد تهاجم قرار دهند. حیوانات یک منبع مهم کچلی قابل انتقال برای انسان چه در جوامع شهری و چه در روستا محسوب می شوند. به همین دلیل مسئله کنترل در ماتوفیتوز در حیوانات از نظر بهداشت عمومی دارای اهمیت است [۱]. حضور پوسته های اپیدرمی آلوده حیوانات در اماکن عمومی می‌تواند یک منبع بالقوه عفونت باشد. بطوری که بیماری می تواند از یک شکنندگی جزئی موها همراه با *scaling* (تجمع سلول های اپیدرمال سطحی مرده) تا ضایعات کلاسیک بیماری که بصورت آلوپسی های گرد، فوکال،مولتی فوکال تا منتشر متفاوت باشد. بالطبع بیماری در حیوانات دچار ضعف ایمنی خصوصا حیوانات دچار بیماری های سیستمیک و تضعیف کننده سیستم ایمنی با شدت بیشتری ایجاد می گردد و شکل منتشر می یابد. برای درمان این بیماری در حال حاضر علاوه بر کنترل بیماری های زمینه‌ای و شرایط مستعد کننده از دارو های مختلفی بشکل موضعی، غوطه وری و عمومی استفاده می‌شود. درماتوفیت‌های مهم آلوده کننده حیوانات، در سه گروه قارچی که بیشترین موارد کلینیکی مربوط به درماتوفیت‌ها را در سگ ها و گربه‌ها باعث می شوند: *میکرو سپوروم کنیس*، *میکرو سپوروم جیپسئوم* و *تریکوفیتون متاگروفیتس* است [۱]. رینگ ورم(کچلی حلقه‌ای) معمول ترین علامتی است که در عفونت‌های سطحی متعدد در لایه‌های کراتینی پوست، مو، پر و شاخ در حیوانات مزرعه، خانگی و حیوانات وحشی، پرندگان و همچنین انسان دیده می‌شود. انتقال ارگانیسم از حیوان به انسان، حیوان به حیوان و همچنین انسان به انسان به اثبات رسیده است. درماتوفیت‌ها تنها بر روی بخش کراتینی غیر زنده پوست، مو و ناخن قادر به بقا بوده و عموماً لایه های زنده پوست را مورد تاخت و تاز قرار نمی‌دهند. حیوانات جوان نسبت به بالغین بیشتر مبتلا شده ولی در عین حال حیوانات ناتوان و یا آنهایی که دچار ضعف سیستم ایمنی می‌باشند نیز در هر سنی بسیار حساس هستند [۲]. قارچ ها ممکن است بصورت مکانیکی از سطح پوست پاک شوند و یا بدلیل عدم توانایی در رقابت کردن با فلور باکتریایی نرمال آن حذف گردند و یا سرانجام ممکن است در محل پوست ثابت شده و ایجاد بیماری کلینیکی کنند. این مواد راه خود را از اپیدرم زنده به سمت درم که دارای یک شبکه عروقی و پتانسیل بالقوه در پاسخ به تهاجم این گونه توکسین‌ها و آلرژن‌هاست، پیدا می‌کنند و پاسخ به صورت یک واکنش التهابی مشخص می‌شود. موجودیت این قارچ ها به مقدار زیادی به احضار نکردن این واکنشهای التهابی بستگی دارد و در شرایط ایده‌آل، قارچ مقدار پایینی از این توکسین‌ها و آلرژن‌ها را تولید می‌کند که پس از آلوده کردن پوست انسان بثورات جلدی شدیدی ایجاد می شود [۲]. زمانی که قارچ بر روی بافت ثابت شد، سرعت رشد آن باید در کمترین حالت برابر با سلول های بافتی که تعویض می‌شوند و می‌افتند باشد تا بتواند بر روی بافت باقی بماند. برای تمام درماتوفیت‌ها، مرحله اول عفونت، کلونیزه شدن بر روی لایه شاخی بافت است. جهت رشد اولیه نسبتاً به سمت پایین تا جانبی است و برای بیشتر زنده ماندن، رشد باید یکسان و آرام صورت گیرد. از آنجایی که درماتوفیت‌ها قدرت تهاجم به بافت زنده را ندارند، تنها مکانیسمی که می‌توان به بیماریزایی این ارگانیسم‌ها نسبت داد، دخالت در سنتز و ترشح توکسین‌ها، مواد محرک و یا آلرژن‌هاست [۳].

داروی تربینافین(*Terbinafine*) یک داروی ضدقارچی سنتزی از کلاس *Allyamine* بوده که باعث مهار آنزیم اسکوالین اپوکسیداز *Sequalen epoxidase* می‌شود، این آنزیم در سنتز *Ergosterol* نقش دارد. اشکال دارویی تربینافین نظیر قرص ۲۵۰ میلی گرم و کرم ۱٪ است. میزان پاسخ به درمان ایزوله های *ترایکوفایتون متاگروفیتس* به نانوداروی تربینافین در مقایسه با تربینافین تغییر می‌کند. اهمیت و هدف تحقیق حاضر، بررسی اثر درمانی داروی تربینافین بر روی مدل حیوانی و همچنین تبدیل این دارو به ابعادی کوچک در حد نانو جهت افزایش اثرات ضد قارچی آن می‌باشد که هم بتواند حساسیت را بالا برده و هم مقاومت به درمان را کاهش دهد و در نهایت با این روش نیمه عمر دارو را افزایش و عوارض جانبی و طول دوره درمان را کاهش داد. در مرحله انتشار قارچ که به صورت گریز از مرکز، به صورت فرم حلقه‌ای صورت می‌گیرد. با توجه به شیوع بالای

درماتوفیتوزیس و با در نظر گرفتن درمان مشکل در برخی فرم‌های این بیماری و عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای ضدقارچی، نیاز به جایگزینی مناسب با داروهای فعلی ضروری به نظر می‌رسد.

روش کار

در این مطالعه که از نمونه‌های جداشده از بیمارانی که ضایعه انسانی بوده ولی منبع و منشا آن حیوانی است که مبتلا به تریکوفایتون منتاگروفایتیس بودند استفاده شد. جهت کنترل و صحت نمونه‌های جدا شده بر روی محیط سابورودکستروز آگار حاوی سیکلوهگزامید و کلرافینیکل کشت داده شد و محیط کشت ها در دمای ۲۵ تا۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ الی ۴ هفته قرار گرفت. کلنی مسطح، به رنگ کرم با سطحی پودری ظاهر شد. علت ظاهر پودری وجود دسته های فراوان میکروکونیدیا است که در انواع حیوان دو ست،ایجاد د سته های فراوانی از میکروکونیدی های کروی می نماید، همچنین از محیط سیب زمینی حاوی دکستروز آگار (PDA)استفاده گردید که در حقیقت پشت کلنی در محیط PDA که ترایکوفایتون منتاگروفایتیس کشت داده شد رنگی ایجاد نکرد، همچنین از تست سوراخ مو جهت تأیید این واریته ا ستفاده شد [۴].

آماده سازی قارچ بیماریزا و دارو: دراین مطالعه علاوه بر نمونه‌های تأیید شده، از سوش های استاندارد ATCC۱۸۷۴۸ توسط شرکت تحقیقاتی و تولیدی آرکاطب روهام(ATR) تهیه گردید. سپس جهت تهیه سوسپانسیون های قارچی، ایزوله های تریکوفیتون منتاگروفایتیس در محیط PDA داخل لوله کشت داده شدند تا اسپورزا گردید. از کشت‌های تازه ۱۴-۱۰ روزه قارچ ها در حرارت ۲۸درجه سانتیگراد برای آزمایش استفاده شد. سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۵ درصد توئین ۸۰ به لوله های حاوی کشت ۱۴-۱۰ روزه هر قارچ ریخته شد سپس با مالیدن سواپ پنبه‌ای ا ستریل یا پیپت پاستور استریل به سطح کلنی اسپورها آزاد شدند. سوسپانسیون حاصل به منظور حذف ذرات اضافی و قطعات هایفی از فیلتر میلی‌پور (۴۲ میکرون) عبور داده شد [۵]. ماده و ساختار اصلی داروی تربینافین آماده شده از دو مجتمع پارس دارو و پاک دارو تهران تهیه شد و جهت تولید نانودارو به شرکت نانوزینو ارسال شد.

حیوان آزمایشگاهی: در این مطالعه تعداد۳۰ عدد خوکچه هندی نر با طیف وزنی یکسان (۳۵۰ تا ۴۰۰ گرم) به مدت یک هفته برای آداپتا سیون در شرایط اوپتیمم (۱۲ ساعت تاریکی در رطوبت ۳±۵۰٪ و درجه حرارت c^o ۱±۲۴) و با جیره پایه تغذیه یکسان نگهداری شدند. آماده سازی مدل حیوانی شامل دو مرحله تخریش و بستن است. در قسمت پشتی هر یک از حیوانات در بین دو کتف آنها ناحیه‌ای به اندازه ۴ سانتی‌مترمربع ترا شیده شده و بو سیله یک سرسوزن، خراشیدگی‌های اندکی(بدون ایجاد زخم) بوجود آمد. سپس همانطوری که در مطالعات قبلی نیز به آنها اشاره شده است، غلظت $۱۰^۶$ عدد ا سپور قارچی در هر میلی‌لیتر در ناحیه خراش داده شده قرار داده و توسط وازلین به مدت ۲۴ ساعت بسته شد.

درمان گروه تیمار، هر ۱۲ ساعت یکبار تا بهبودی بالینی و مایکولوژیک ادامه پیدا کرد. در طول مدت درمان، نانودارو توسط آب‌پاش طوری در موضع قرار گرفت که علاوه بر سطح آلوده، یک حاشیه چند سانتی‌متری نیز از موهای سالم اطراف خیس شدند. کرم تربینافین ۱٪ به شکلی روی ضایعه قرار گرفت که علاوه بر ایجاد یک لایه کامل و نازک، ۲ سانتی‌متر از حا شیه ضایعه را نیز پو شش داد. در مراحل پایانی مطالعه به منظور تایید تاثیر درمان، کشت قارچی انجام پذیرفت. درطول مدت درمان، هر ۵ روز یکبار، عکس برداری انجام گرفته و هر یک از عکس ها توسط clinical lesion scoring system درجه بندی شد.

جدول ۱ – سیستم درجه بندی ضایعات جلدی و پوستی ناشی از ابتلای قارچی تریکوفیتون منتاگروفیتس

ردیف	درجه بندی ضایعات قارچی	درجه مورد نظر
۱	هیچ ضایعه‌ای وجود ندارد	۰
۲	تنها موریزی	۱
۳	سرخی به همراه پوسته	۲
۴	سرخی قابل ملاحظه به همراه پوسته بزرگ	۳
۵	اولسر و اسکار به همراه مواردی که در درجه ۳ وجود دارند	۴
۶	ضایعات پوستی شدید،قرمزی،کراست،زخم و بدون رشد مو	۵

نتایج

نتیجه بررسی‌های مرفولوژیک ضایعات که هر ۵ روز بوسیله عکس‌برداری انجام گرفته است، این تغییرات را به خوبی نشان می‌دهند. در طول مدت درمان با تربینافین۱٪ و مقایسه با فرم نانوداروی آن مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به این که دو گروه کنترل مثبت و منفی جهت مقایسه نتایج در مراحل کاری لحاظ شده بود. این در حالی است که عدد درجات ضایعه(*score average lesion*) در مورد گروه نانوتربینافین ۱ درصد، درمقایسه با فرم معمول دارو این اختلاف معنی دار وجود داشت (p<۰/۰۵).

روند کاهش درجه ضایعات در گروه‌های درمانی نانودارو، در بین روزهای ۱۰ تا ۱۵ اتفاق افتاد که با افزایش در ۵ روز بعدی همراه شده است. مجددا از روز ۲۰ این روند کاهشی آغاز شده و با یک روند منطقی تا روز ۴۰ ادامه یافت. بطوری که در روز ۴۰ همگی گروه‌ها به جز کنترل مثبت *score* صفر داشتند.

همین بررسی نشان می‌دهد که گروه نانوداروی تربینافین و کنترل مثبت از روز ۲۵ و ۳۰ تا پایان درمان اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است. این درحالی است که فرم معمول داروی تربینافین۱٪ تنها در روز ۳۵ اختلاف آماری معنی دار دارند(p<۰/۰۵). بررسی های آماری بین گروه که فرم معمول تربینافین یک درصد و کنترل منفی، اختلاف آماری معنی داری را در همه روزها به جز روز ۳۵ و ۴۰ نشان می‌دهند(p<۰/۰۵).

همین بررسی نشان می‌دهد که گروه نانو داروی تربینافین و کنترل مثبت به ترتیب از روز ۲۵ و ۳۰ تا پایان درمان اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است (p<۰/۰۵). متوسط *score* در گروه نانو تربینافین یک درصد در هنگام آغاز درمان یعنی روز ۵، ۲/۱۶ است که اندکی کمتر از گروه های کنترل مثبت می‌باشد. ضمن اینکه درجه ضایعات در روز ۲۵ و ۳۰پس از عفونت در گروه نانو تربینافین ۱ به پایین ترین score رسید.

بررسی‌های آماری بین گروه فرم معمولی تربینافین ۱ درصد و کنترل منفی، اختلاف آماری معنی داری را در همه روزها به جز روز ۳۵ و ۴۰ نشان می‌دهند(p<۰/۰۵). همین بررسی نشان می‌دهد که بین گروه‌های نانوداروی تربینافین و کنترل مثبت از روز ۲۵ تا پایان درمان اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است (p<۰/۰۵).

متوسط *score* در گروه فرم معمول تربینافین ۱در صد در هنگام آغاز درمان، عدد میانگین ۴/۵ را نشان می‌دهد که بسیار بیشتر از سایر گروه‌هاست. تا ۱۰ روز اول این *score* افزایش شدیدی را نشان داد(بعلت مقاومت دارویی تغییرمحسوسی در بهبود ضایعات مشاهده نشد) اما در روزهای بعدی روند کاهشی آن بهتر شد تا اینکه در روز ۴۰ به صفر رسید. همین بررسی نشان داد که گروه‌های درمانی فرم معمول تربینافین تنها در روز ۳۵ اختلاف آماری معنی داری داشتند.

مقایسه آماری گروه نانوداروی تربینافین هیچگونه اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نمی‌دهد واز نظر آماری در هیچ یک از روزها، اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و این چنین مقایسه ای بین گروه‌های فرم معمول تربینافین یک درصد تنها در روزهای ۲۰ و۲۵ روند افزایشی را نشان داد.

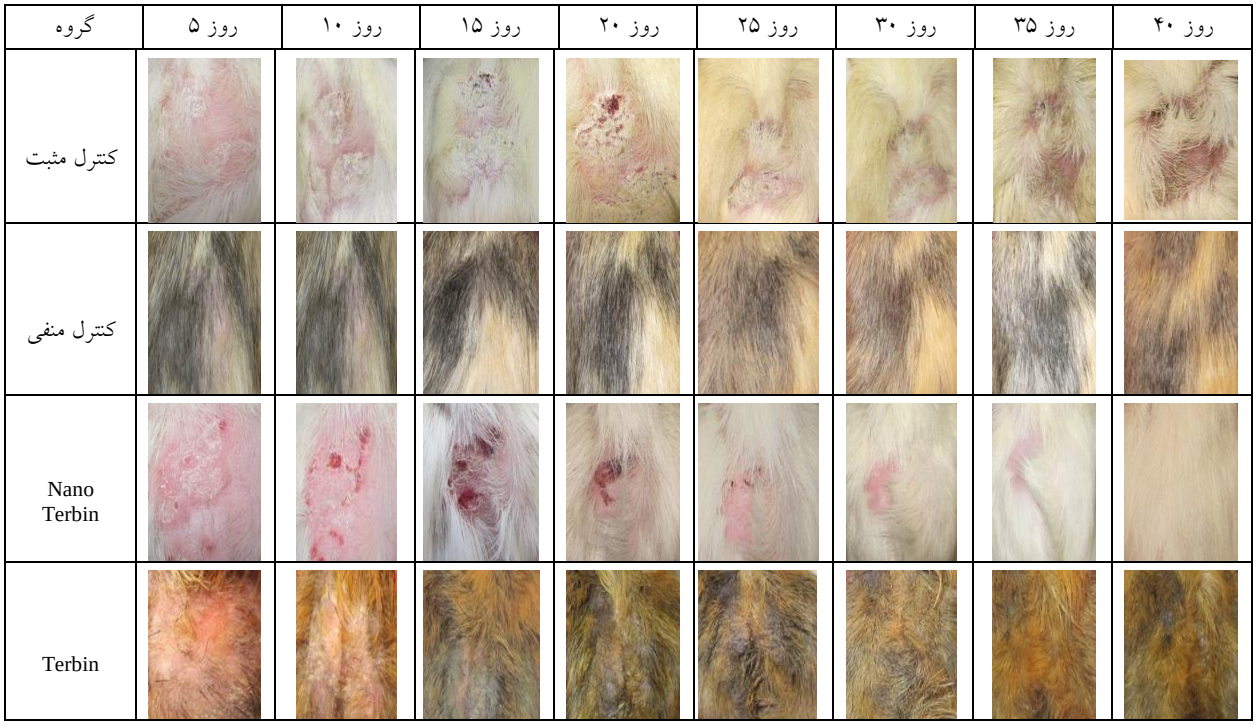
در حالی که در فرم معمول تربینافین تا روز ۱۰ روندی در بهبود مشاهده نشد و بهبودی علایم از روز ۱۵ اثرات دارو کم کم تاثیرات خود را اعمال کرد ودر روزهای بعدی روند کاهشی آن ادامه پیدا کرد تا اینکه در روز ۴۰ به صفر رسید (p<۰/۰۵). مشاهدات صورت

گرفته بر روی درجات ضایعه در داخل هر گروه موید تغییرات گفته شده فوق است.

شکل زیر(۱) نشان دهنده آنست که در بازه زمانی مشابه، ۱۶٪ از حیوانات در درجه بندی ۴ از گروه نانودارو تربینافین قرار داشتند، از حیوانات گروه تربینافین ۵۰٪ وارد فاز درجه بندی ۴ شده‌اند.

در شکل های زیر (شماره ۱) نمونه‌ای از تصاویر بهبودی مربوط به هر گروه آمده است و در مورد گروه لیپوزومال (بلانک) از گروه کنترل مثبت اندکی کمتر را نشان می‌دهد.

بررسی های آماری بین گروه لیپوزوم و کنترل منفی، اختلاف آماری معنی داری را در همه روزها به جز روز ۴۰ نشان می‌دهند(p<۰/۰۵). نمونه برداری های قارچی در روزهای ۳۰، ۳۷ و ۴۲ نشان دهنده تاثیر یا عدم تاثیر نانودارو در گروه‌های مختلف است. قطع درمان زمانی انجام شد که حداقل ۲ کشت پشت سرهم در کلیه حیوانات تمام گروه ها منفی شد.



شکل ۱ – مقایسه روند بهبودی در بازه زمانی. PC= کنترل مثبت، NC = کنترل منفی، Nano Terbin - Terbin

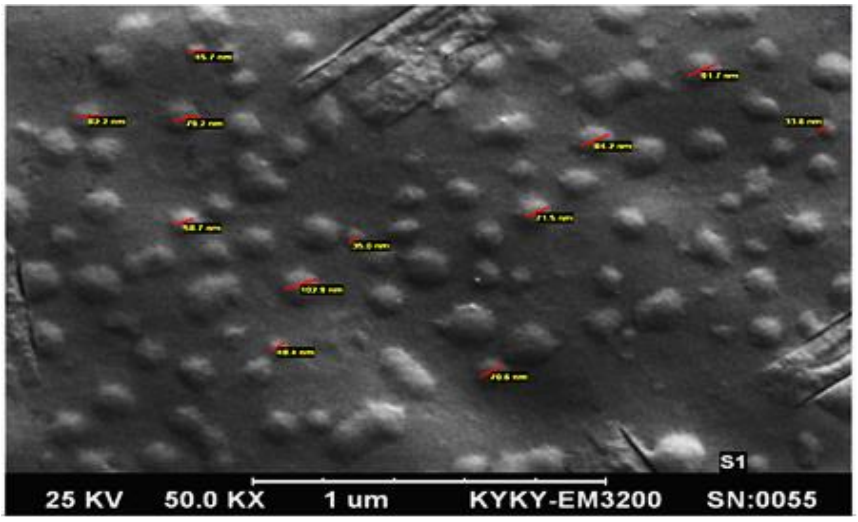
نتایج آنالیزهای تاییدیه نانو داروی تربینافین تو سط شرکت بیم گسترتابان انجام و مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب آزمایش SEM– FTIR و آنالیز پتانسیل زتا(ZETA) آزمون DLS در زیر آمده است. روشهای زیر مربوط به بررسی مولکولی ذرات نانو هستند که به ترتیب آزمایش میکرو سکوپی SEM– FTIR و آنالیز پتانسیل زتا(ZETA) آزمون dynamic light scattering(DLS) که در زیر آمده است: آزمون SEM-ZETA-(dynamic light scattering) DLS تست‌های تاییدیه نانودارو هستند که توسط شرکت بیم گستر انجام شدند(نمودارهای۲تا۴).

در بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره یا SEM نوعی از میکروسکوپ الکترونی که قابلیت عکس‌برداری از سطوح با بزرگنمایی ۱۰ تا ۵۰۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر و بسته به نوع نمونه دارد. میکروسکوپ الکترونی روبشی، از مناسب‌ترین وسایل در دسترس برای آزمایش و آنالیز مورفولوژی نانو ساختارها و شناسایی ترکیبات شیمیائی است.

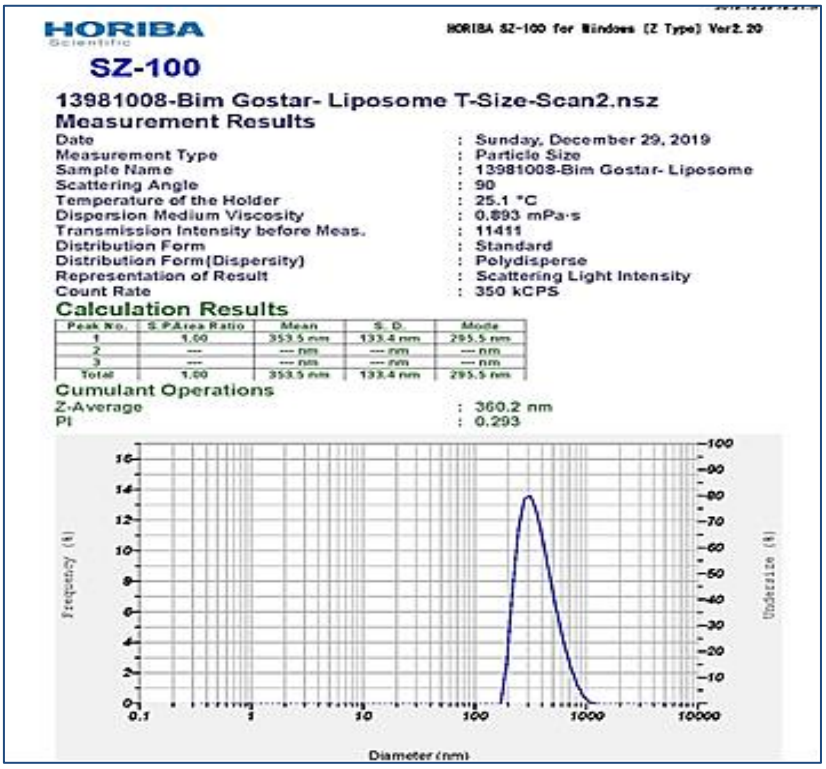
توا نائی SEM برای بررســـی ســـطح مواد بی نظیر بوده و حائز برتری‌های فراوانی نســـبت به میکروســـکوپ‌های نوری اســـت. در میکرو سکوپ نوری تـشکیل تـصویر با ا ستفاده از نورهای منعکس شده از سطح نمونه صورت می‌گیرد در حالی که در SEM این مهم با بکارگیری الکترون‌ها میســـر می‌شـــود. طول موج الکترون‌ها از فوتون های نور کو تاه‌تر بوده و طول موج کو تاه‌تر با عث ایـجاد و ضوح، قدرت تفکیک و حـصول اطلاعات منا سب تر می شود. در حقیقت در SEM هیچ سیستم نوری-الکترونی برای تـشکیل تـصویر و بزرگنمایی وجود ندارد، بلکه تصـــویر از مشـــاهده نقطه به نقطه پدیده‌های ســـطح منتج از اثر متقابل پرتوی الکترونی با ســـطح نمونه تشکیل می‌شود.

آنالیز FTIR (Fourier transmission infra-red) مخفف واژه تبدیل فوریه مادون قرمز اســـت که یکی از روش های جدید طیف سنجی با مادون قرمز است. در طیف سنجی مادون قرمز، پرتو IR به نمونه برخورد می‌کند. آ نالیز پتانســـیل زتا یه ذره در اکثر موارد به عنوان شاخصی برای بررسی پایداری پراکندگی نمونه مورد ا ستناد واقع می گردد. مقادیر بالا از نظر اندازه در پتانیســـل زتا (نمودار ۲)، به معنای این است که سوسپانسیون ازحیث پایداری الکترواستاتیک در و ضعیت مطلوبی ا ست. پتانـسیل زتا به عنوان تابعی از PH یا به عنوان عاملی در تغییر شـــیمی نمونه، برای ایجاد فرمولاســـیون های جدید برای با عمر پایداری طولانی تر می باشـــد. در نقطه مقابل این عمل، مـشخص نمودن نقطه ای که پتانـسیل زتا در آن صفر ا ست و نقطه ایزوالکتریک می باشد می‌تواند شرایط بهینه را برای جداسازی ذرات یا ایجاد لخته،فراهم نماید(نمودار ۱).

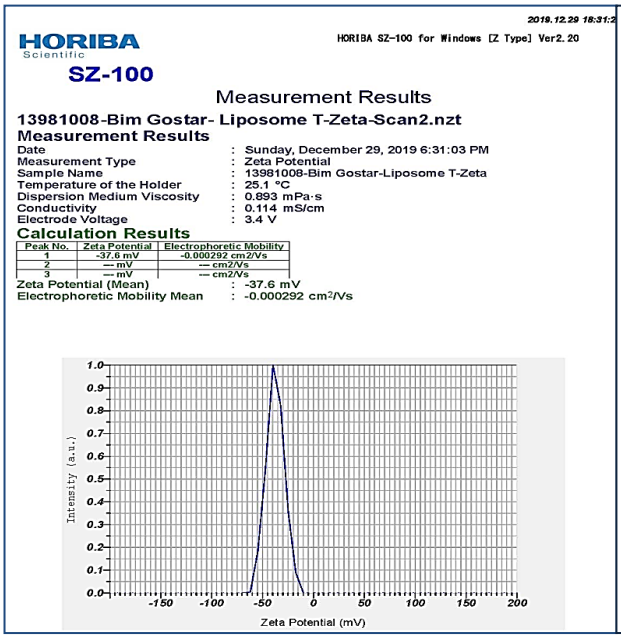
نمودار ۱- آنالیز FTIR (Fourier transmission infra-red) (طیف سنجی با مادون قرمز)



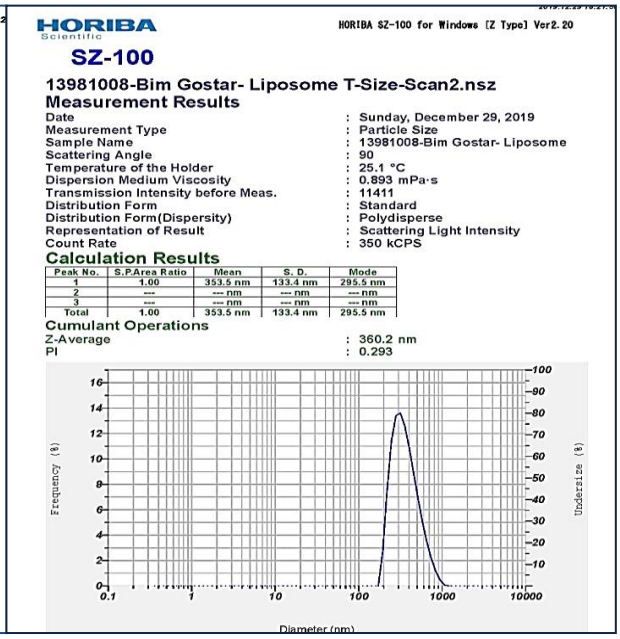
شکل۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو داروی تربینافین فعال



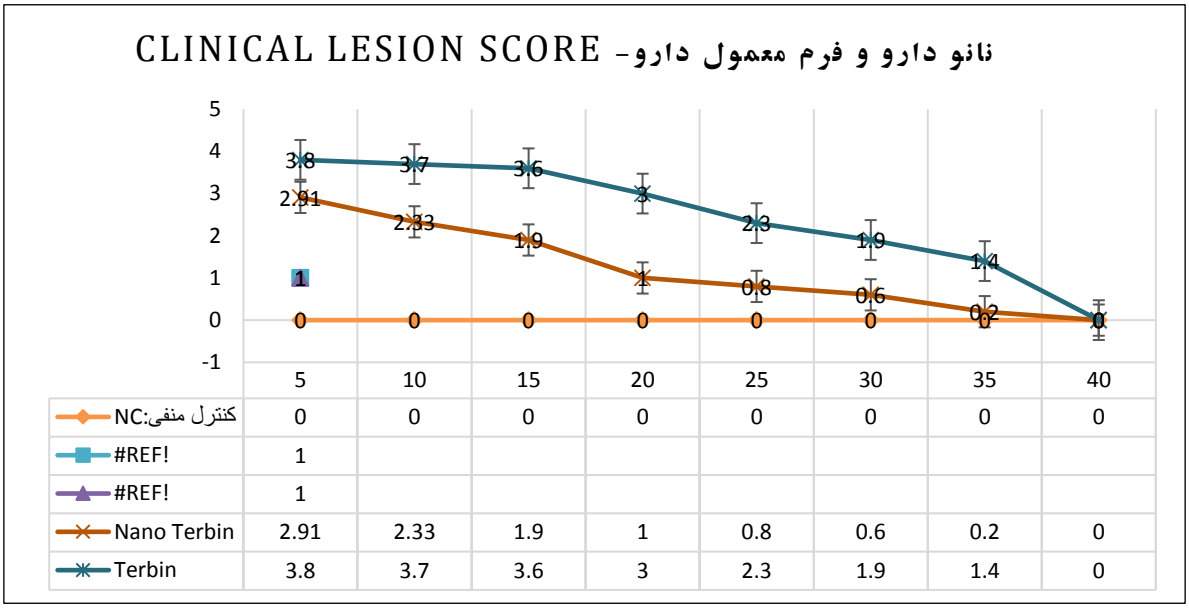
نمودار ۲- نمودار پتانسیل زتا داروی نانو تربینافین



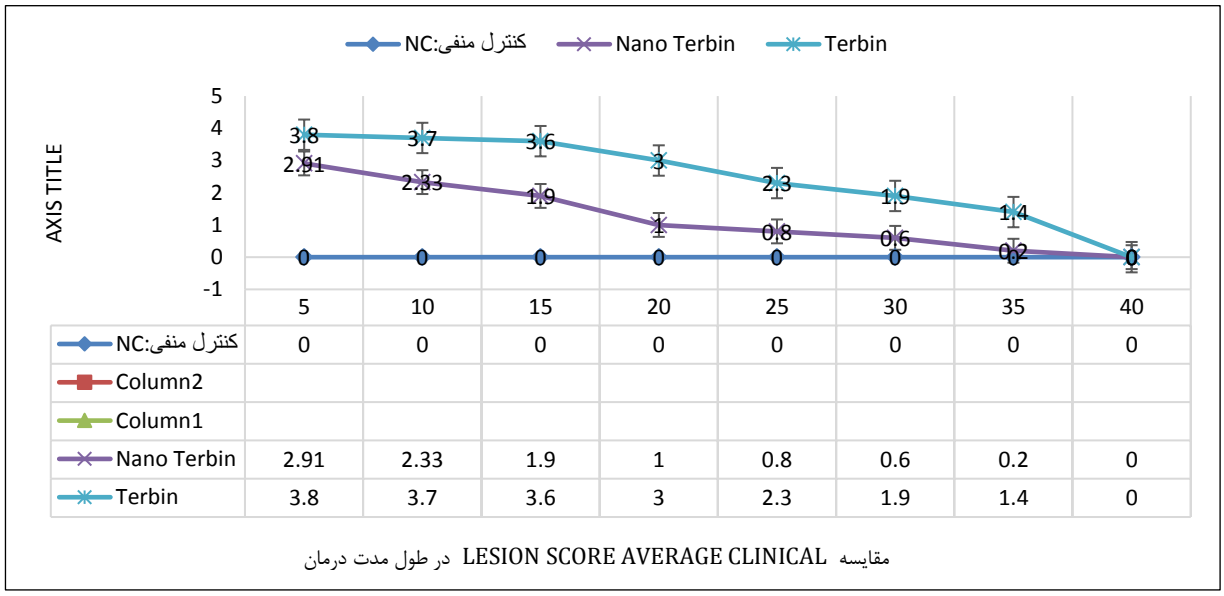
نمودار۴- آنالیز پتانسیل زتا(ZETA)



نمودار۳- آنالیز DLS



نمودار ۵- تاثیر نانو داروها در مقایسه با فرم معمول دارو Clinical lesion score



نمودار ۶ – مقایسه نانو دارو در ضایعات Clinical lesion score average در طول مدت درمان. Pc= کنترل مثبت، NC = کنترل منفی، Liposome ، Nano –Terbin Nano

جدول ۲ – مقایسه نانو دارو lesion score average Clinical در طول مدت درمان. Pc= کنترل مثبت ،NC = کنترل منفی ، Liposome ، Nano–Terbin

گروه average/day	روزهای مورد آزمایش							
داروهای تیمار	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
تربینافین	۳/۸	۳/۷	۳/۶	۳	۲/۵	۲	۱/۴	۰
نانوتربینافین	۲/۹۱	۲/۳۳	۱/۹	۱	۰/۸	۰/۶	۰/۲	۰
لیپوزوم	۴	۳/۸	۳/۵	۳	۲/۷	۲	۱/۸	۰
کنترل مثبت	۴	۳/۹	۳/۸۸	۳/۸۳	۳/۶۰	۳/۵	۳/۴۷	۳/۱
کنترل منفی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۳- نتایج کشت در گروه های مختلف در سه دوره (کنترل مثبت یعنی= ۶/۶ ، به معنی ۱۰۰ درصد علایم مشاهده شد و کنترل منفی= ۰/۶ یعنی هیچ عارضه بالینی از علائم بیماری قابل مشاهده وجود نداشت)

کشت نمونه مثبت			
روزها	روز ۳۰	روز ۳۷	روز ۴۲
گروه	اول	دوم	سوم
کنترل مثبت	(٪۱۰۰)۶/۶	(٪۸۳/۳)۶/۵	(٪۸۳/۳)۶/۵
کنترل منفی	(٪۰) ۰/۶	(٪۰) ۰/۶	(٪۰)۰/۶
تربینافین	۶/۲	۶/۱	(٪۰)۶/۰
نانوتربینافین	(٪۱/۶)۶/۱	(٪۰)۶/۰	(٪۰)۶/۰

بحث

با توجه به شـــیوع بالای درماتوفیتوزیس و با در نظر گرفتن درمان مشکل در برخی فرم های این بیماری و عوارض جانبی ناشی از مصـــرف داروهای ضـــدقارچی، نیاز به جایگزین مناســـب با مقاومتهای دارویی ایجاد شده در بیماران ضروری به نظر می رسد. به منظور ارزیابی پیش کلینیکی ترکیبات جدید ضـــد قارچی که می توان برای درمان در ماتوفیتوزیس بکار برد، مطالعات Invivo با استفاده از عفونت های تجربی حیوانی در کنار تست های حساسیت دارویی روی ایزوله های بالینی در Invitro ضـروری اسـت. شـدت عفونت های درماتوفیتی در حیوانات آزمایشـــگاهی و تاثیر درمان ضدقارچی بر روی ضایعات را می توان با آزمایشات قارچ شناسی بر اساس مطالعات کشت و نیز روش های بافت شناسی روی بافت پوست عفونی شده بررسی نمود.

تاکنون دارو های مختلفی برای درمان در ماتوفیتوزیس آزموده شده‌اند. از بین داروهای عمومی و موضعی آزموده شده، داروهای موضـــعی به علت جلوگیری از آلوده شـــدن محیط، اهمیت ویژه ای دارند و اساس درمان این بیماری به شمار می‌روند [۶]. به منظور بهبود انتقال داروها از طریق پوست فناوری های متنوع شیمیایی و فیزیکی ابداع شـــده اند.یک نمونه از این فناوری ها بکارگیری نانو ذرات در دارورســـانی اســـت. با توجه به اندازه بســـیار کوچک راه‌های ورود

ترکیبات به پوست(کمتراز ۱۰ نانومتر)،برای تهیه فرمولاسیون های نانوذرات باید از ترکیباتی استفاده شود که بتوانند به ورود مواد به لایه‌های عمیق‌تر پوست کمک کنند[۷]. ترکیباتی مانند سورفاکتانت ها در فرمولاسیون نانو ذرات به عنوان عاملی برای بهینه سازی جذب مواد از خلال پوست شناخته شده اند. به همین دلیل است که در ساختمان بیشتر نانو ذراتی که قابلیت مصرف موضعی یافته اند(مانند نانوذرات لیپیدی و نانوذرات پلیمری)،از سورفاکتانت ها استفاده شده است[۸].

تاکنون گیاهان دارویی و همچنین داروهای شیمیایی مختلفی برای بررسی اثر درمانی بر درماتوفیتوزیس مورد مطالعه قرار گرفته اند، اما هیچگونه مطالعه مدونی برای بررسی نحوه تأثیر نانو داروهای تربینافین بر روی مدل حیوانی انجام نگرفته است. تحقیق حاضر برای مقایسه اثرات درمانی نانوداروهای تربینافین۱٪ با فرم معمول دارو در ترایکوفایتون منتاگروفایتیس انجام گرفته است.

در مرحله اول، با روش In vitro، متوسط غلظت مهار کننده یا MIC دارو مشخص گردید و بر طبق غلظت های ۱ ، ۰/۸ ، ۰/۶ و ۰/۵ ٪ مشخص شد. سپس همانطوری که در مطالعات قبلی انجام داده شده است[۹] مدل In vivo ایجاد گردید. ۵ روز پس از آلودگی علائم بیماری ظاهر و درمان آغاز گردید و تا روز ۴۰ ادامه یافت.یکی از نکات قابل توجه که در نگاه اول به چارت خطی تغییرات در lesion score average Clinical به نظر می‌رسد، افت شدید score بین روزهای ۱۵ تا ۳۰ نسبت به دو گروه تربینافین ۱٪ قابل مشاهده هست. در دو گروهی که فرم معمول دارو بودند افزایش و کاهش، به شکلی که در گروه های نانوداروها اتفاق افتاده است، وجود ندارد.

اگرچه در گروه چهارم(فرم معمول تربینافین ۱٪) نیز اول روند بهبودی و تغییرات در ضایعات کم بود(تا روز ۱۵) ولی سپس کاهش score و بهبودی دیده می‌شود اما افزایش score به میزان ۰/۱ (همانطور در جدول ۴ آمده است) در گروه نانو دارو در مقایسه با فرم معمول دارو که score در آن‌ها ۱ درجه افزایش داشته، دیده می شود. مضاف بر اینکه پس از روز ۲۵، میزان کاهش score در گروه نانو داروهای تربینافین ۱٪ و فلو کونازول۰٫۵ ٪ شیب تندی می‌گیرد و تا روز ۴۰ به صفر می رسد. نکته دیگر مقایسه عدد آغازین score در هنگام شروع درمان در بین گروه‌های تربینافین ۱٪ با نانو داروی این داروها و کنترل مثبت است که این عدد برای گروه نانوداروی تربینافین ۱٪کمتر از سایر گروه‌هاست ، بنابراین کاهش score پس از روز ۲۵ و۳۰ در گروه نانو تربینافین۱٪ یک موفقیت درمانی محسوب میشود هرچند که اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه نانو داروی هم وجود نداشته است.

در مورد گروه لیپوزومال(بلانک)، score آغازین در روز ۵ برابر با کنترل مثبت است. بین روزهای ۵ تا ۱۰ در گروه‌های معمول تربینافین ۱٪ افزایش score دیده میشود که شاید در روزهای آغازین درمان تا حدودی عادی باشد. با در نظر گرفتن score در روز آغازین درمان و روند کاهشی آن در روز ۱۵ تا ۲۰ ادامه این روند تا روز ۴۰ به صفر می رسد، و با در نظر گرفتن اینکه در مدت مشابه (روزهای ۱۵ تا ۲۰) score در گروه نانو داروها ، درمان با نانوداروها سریعتر، با شدت و موفقیت بیشتر به نظر می‌رسد.

مقایسه جدول میانگین score در روزهای مختلف تربینافین۱٪، عدد آغازین average score و روند بهبودی یکسانی را نشان می‌دهند. با در نظر گرفتن همه این تفاوت ها که بین فرم معمول و فرم نانو داروها گفته شد، تمامی آنها در روز ۴۰ بهبودی مرفولوژیک داشتند. اما آنچه که این گروه‌ها را از هم متمایز می‌سازد، نتیجه کشت در اولین نمونه‌برداری است که در روز ۳۰ انجام گرفته است.

کشت اول در گروه‌های فرم معمول داروها از نظر مایکولوژیک مثبت بودند. پس روز ۳۷ نمی‌توانست در مورد این گروه‌ها زمان پایان درمان باشد. در حالی که برای گروه نانوداروها این چنین می‌توانست باشد، هرچند درمان تا اخذ نتیجه کشت سوم ادامه یافت. برای انجام تحقیقات بیشتر و جامع‌تر بروی این بیماری، همچون سایر بیماریها، تلاشهای متعددی برای ایجاد مدل های حیوانی انجام گرفته است.

Shimamura و همکاران در سال ۲۰۱۲ در یک مقاله تحلیلی،بطور کامل نحوه ایجاد عفونت قارچی را مدل حیوانی توضیح داده‌اند. تاریخچه کارهای انجام شده قارچی بر روی مدل حیوانی بوده است مثلا نحوه تخریش و تلقیح سوسپانسیون قارچی به پوست حیوان بود[۱۰].

Cavalcanti و همکاران در ۲۰۰۲ و Lee در سال ۲۰۰۷ از روش های مشابه به آنچه Sakai توضیح داده است برای ایجاد مدل حیوانی استفاده کرده‌اند[۱۱]. پیشتر اثرات اسانس گیاه درمنه بر روی

عوامل درماتوفیتوزیس و میکروسپوروم کنیس مطالعه شده است. اولین بار در سال ۱۹۰۸ اولین مدل تو سط Bloch معرفی گردید و برای اولین بار Sakai بود که مطالعات حیوانی بر روی درماتوفیتوزیس تجربی انجام داد و تا ۱۹۶۲ تحقیقات گسترده‌ای برای ایجاد مدل حیوانی درماتوفیتوزیس انجام گرفت.

Chen و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات ضد باکتریال، ضد قارچی، ضد دردی و ضد آیمریایی کامفور را که از اجزای اصلی درمنه است به طور کامل توضیح و اثبات کرده اند [۱۲].

Dash و همکاران در سال۲۰۱۰ مرور بسیار جامعی بر خواص کیتو سان و تاثیر آن بر Drug delivery system دا شته‌اند و کیتو سان را یک پلی‌الکترولیت با خاصیت ضد میکروبی، ایجاد ژل و تجزیه زستی معرفی نموده‌اند و ذاتا آنرا یک ماده تجزیه پذیر غیر سمی دانسته‌اند و به دلیل این خصوصیات کاربرد آنرا در طب، مجاز و حتی مفید می‌دانند. کاربرد کیتو سان در مهند سی بافت، تو سط این دانشمندان به طور کامل توضیح داده شده است. براساس همین گزارش، کیتوسان را میتوان در مهندسی بافت کبد، غضروف، استخوان و اعصاب به‌علاوه در سیستم‌های دارو رسانی در بدن در مورد ضدالتهاب‌ها، واکسن ها، آنتی بیوتیک ها، داروهای ضد سرطان و پپتیدها به آسانی استفاده کرد [۱۳]. خصوصیات ذکر شده در مورد کیتوسان توسط سایر محققین [۱۴] نیز بیان و تاکید شده است.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که نانوداروی تربینافین۱٪ برای درمان درماتوفیتوزیس ناشی از تریکوفایتون منتاگروفایتیس مناسب و از نظر تأثیر درمانی با فرم معمول دارو شدت و سرعت بهبودی قابل قیاس تری دارند. در نهایت با این روش می توان نیمه عمر دارو را افزایش و عوارض جانبی و طول دوره درمان را کاهش داد. پیشنهاد می شود که در مطالعات آینده از رقت‌های مختلف نانو داروی تربینافین ۱٪ استفاده و مقایسه نمود، همچنین مقایسه فرم لیپوزومال با فرم‌های پلی ساکاریدی یا نقره و کیتوسان یا ترکیب هردو فرم باهم و مقایسه اثرات درمانی در مدل حیوانی بررسی گردد. در زمینه نانودارو می‌توان نحوه اثر نانوا سانس گیاهی را در شرایط تغذیه ای مختلف مدل حیوانی، در مقایسه با سایر داروهای مو ضعی برر سی نمود. همچنین برای بررسی قدرت اثر دارو در شرایط طبیعی، می‌توان آزمون‌های بالینی انجام داد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر اقتباسی از پایان نامه دکترای تخصصی بوده که با کد اخلاقی IR.IAU.SRB.REC.1398.179 به ثبت رسیده و در نهایت از حمایت و راهنمایی های کلیه عزیزان (بویژه آقای مجید صادق پور – کارشناس ارشد میکروبیولوژی) که در انجام این پژوهش راهنمایی و مساعدت ارزنده ای داشتند کمال تشکر و امتنان را دارم.

References

1- Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The Artemisia L. genus: a review of bioactive essential oils. Molecules 2012;17(3): 2542-66.

2. Machado GAC. Dermatopatias diagnosticadas em cães no hospital de medicina veterinária da Universidade Federal da Bahia por avaliações histopatológicas (2007-2016) e clínico-laboratoriais (2015-2017). 2017.

3. Jungerman PF, Schwartzman RM. Veterinary medical mycology1972.

4. John H, David A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast fungi. Approved standard second edition (formerly NCCLS m27A2), Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA 2008;16.

5. Knoll MA, Ulmer H, Lass-Flörl C. Rapid Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Molds by MALDI-TOF MS: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Fungi 2021;7(1): 63.

6. Muller G, Kirk R, Scott D, et al. Immune-mediated disorders. Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, 6th ed WB Saunders Co, Philadelphia, Pennsylvania 2001: 667-779.

7. Scott DW, Miller Jr WH, Griffin CE. Dermatoses of pet rodents, rabbits, and ferrets. Muller & Kirk's Small Animal Dermatology 2001: 1415.

8 Daar J, Khan A, Khan J, et al. Studies on self-nanoemulsifying drug delivery system of flurbiprofen

employing long, medium and short chain triglycerides. Pak J Pharm Sci 2017;30(2): 601-6.

9. Atan NAD, Koushki M, Motedayen M, et al. Type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. Gastroenterology and hepatology from bed to bench 2017;10(Suppl1): S1.

10. Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal model of dermatophytosis. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012;2012.

11. Siripatrawan U, Harte BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. Food hydrocolloids 2010;24(8): 770-5.

12. Chen W, Vermaak I, Viljoen A. Camphor—a fumigant during the black death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon—a review. Molecules 2013;18(5): 5434-54.

13. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in polymer science 2011;36(8): 981-1014.

14. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. International journal of food microbiology 2010;144(1): 51-63.

Mahshid Lalvand [1], Jamal Hashemi Hazaveh[2*], Mansour Bayat [3]

[1-] *PhD student in Veterinary Medicine, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran*

[2-] *Associate Professor of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran*

[3-] *Professor of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran*

***Corresponding Author:**

Associate Professor of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

09121009141

sjhashemi9141@yahoo.com

Investigating Terbinafine in the Treatment of dermatophytosis created in Indian pigs and comparing it with the amount of efficient terbinafine in the commercial drug

Received: 6 Oct 2022 ; Accepted: 13 Mar 2023

Abstract

Introduction: In general, animals are an important source of alopecia for humans, both in urban and rural areas. Therefore, the issue of controlling dermatophytosis in animals is important for public health. The presence of infected epidermal shells in public places can be a potential source of infection. Given the high prevalence of dermatophytosis and considering the treatment of problems in some forms of the disease and the side effects of antifungal drugs, the need for appropriate replacement with current drugs seems essential.

Materials and Methods: Standard Trichophyton mentagrophytes ATCC18748 isolate and clinical isolates of Trichophyton mentagrophytes were used in the present study. 1% terbinafine in nano-form of terbinafine). Inoculation in guinea pigs was performed by the method described by Tagami et al. The site of daily lesion was followed for 20 days in terms of clinical symptoms.

Results: In studies performed on lesion score average in the nano-form group, terbinafine was combined on the first day of treatment, showing a score of 3 (significant redness with large crust). And for the normal form of the drug terbinafine (group 4) shows the number 4 (ulcers and scars along with those in grade 3), the process of reducing the degree of lesions in the treatment groups of nano-drugs, occurred between 10 and 15 days. Which is accompanied by an increase in the next 5 days. And continued with a logical process until the 40th day. On day 40, all groups had a zero score except for positive control.

Conclusion: This study shows that nano-drugs are suitable for the treatment of dermatophytosis caused by Trichophyton mentagrophytes and in terms of the effectiveness of treatment with the usual form of drugs have a more comparable intensity and speed of recovery.

Keywords: *Trichophyton Mentagrophytes*, Nano drugs, Terbinafine, Guinea pig