

مeh shid lajwad<sup>۱</sup>, Jamal ha shmi hzawo<sup>۲\*</sup>,  
نصرور بیات<sup>۲</sup>

## بررسی نانوداروی تربینافین Terbinafine در درمان درماتوفیتوزیس القاشه در خوکچه هندی و مقایسه آن با میزان فعالیت تربینافین موثر در داروی تجارتی

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 می‌شوند به همین دلیل مسئله کترول درماتوفیتوزیس در حیوانات از نظر بهداشت عمومی دارای اهمیت است. حضور پوسته‌های آلوده حیوانات در اماکن یک منبع بالقوه عفونت است. با توجه به شیوع بالای درماتوفیتوزیس و توجه به درمان سخت و طولانی در برخی فرم‌های 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 موثر در مهار قارچ و عوارض جانبی کمتری به همراه داشته باشد. اهمیت و نوآوری تحقیق حاضر، بررسی اثر درمانی داروی تربینافین *Terbinafine* برروی مدل حیوانی (خوکچه هندی) و تبدیل این دارو به ابعاد کوچک در حد نانو جهت افزایش اثرات ضدقارچی آن است که هم بتواند حساسیت را بالا برده و هم مقاومت به درمان را کاهش دهد.

**مواد و روش‌ها:** سوosh استاندارد ترایکوفایتون متاگروفایتس ۱۸۷۴۱ ATCC و ایزوله بالینی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. مدل حیوانی برای ایجاد کچلی، عدد خوکچه هندی که در ۴ گروه تیمار تقسیم‌بندی گردید (کترول مشبت، کترول منفی، فرم معمول تربینافین ۱٪ و فرم نانو داروی تربینافین)، تلقیح در خوکچه هندی به روش تاگامی انجام گرفت. محل ایجاد ضایعه، روزانه از نظر عالمان بالینی به مدت ۲۰ روز برسی 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 از ضایعه (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* (گروه ۴) عدد ۴ 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 روزهای ۱۰ 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 کترول مشبت score صفر داشتند. بررسی‌های آماری بین گروهی که فرم معمول تربینافین یک درصد و کترول منفی، اختلاف آماری معنی داری را در همه روزها به جز روز ۳۵ و ۴۰ نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ). همین بررسی نشان داد که بین گروه نانوداروی تربینافین ۱٪ و کترول مشبت به ترتیب از روز ۲۵ و ۳۰ تا پایان درمان اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان می‌دهد که نانوداروها برای درمان درماتوفیتوزیس ناشی از ترایکوفایتون متاگروفایتس مناسب و از نظر تأثیر درمان با فرم معمول داروهای شدت و سرعت بهبودی قابل قیاس تری 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،  
آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران،  
ایران

۰۹۱۲۱۰۰۹۱۴۱  
sjhashemi9141@yahoo.com

## مقدمه

عین حال حیوانات ناتوان و یا آنهایی که دچار ضعف سیستم ایمنی می‌باشند نیز در هر سی بسیار حساس هستند.<sup>۱</sup> قارچ‌ها 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 آلرژن‌هast، پیدا می‌کنند و پاسخ به صورت یک واکنش التهابی مشخص می‌شود. موجودیت این قارچ‌ها 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 می‌شود.<sup>۲</sup> زمانی که قارچ بر روی بافت ثابت شد، سرعت رشد آن باید در کمترین حالت برابر با سلول‌های بافتی که تعویض می‌شوند و می‌افتد باشد تا بتواند بر روی بافت باقی بماند. برای تمام درماتوفیت‌ها، مرحله اول عفونت، کلوزنیزه شدن بر روی لایه شاخی بافت است. جهت رشد اولیه نسبتاً 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 بیماری‌ای این ارگانیسم‌ها نسبت داد، دخالت در سنتز و ترشح توکسین‌ها، مواد محرك و یا آلرژن‌هاست.<sup>۳</sup>

داروی تربینافین (Terbinafine) یک داروی ضدقارچی سنتزی از کلاس Allyamine بوده که باعث مهار آنزیم ۱ سکوالین اپوکسیداز Sequalen epoxidase می‌شود، این آنزیم در سنتز Ergosterol نقش دارد. اشکال دارویی تربینافین نظیر قرص ۲۵۰ میلی گرم و کرم ۰/۱٪ است. میزان پاسخ به درمان ایزوله‌های تراکوکافایتون متاگروفیتیس 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 ضدقارچی 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

قارچ‌ها ارگانیسم‌های یوکاریوت هتروتروف بوده که برای رشد خود به ترکیبات آماده به عنوان کربن نیازمند هستند. دیواره سلولی قارچ‌ها حاوی پلیمرهای پلی ساکاریدی شامل کیتین، مانان، گلوکان، کیتوزان و بندرت سلولز می‌باشد. قارچ‌های جلدی به نسوج کراتین دار پوست، مو و ناخن حمله کرده و ضایعاتی ایجاد می‌نمایند. درماتوفیت‌ها می‌توانند از کراتین در عنوان منع نیتروژن استفاده کنند و بخش‌های 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 می‌شوند. به همین دلیل مسئله کنترل در ماتوفیتیز در حیوانات از نظر بهداشت عمومی دارای اهمیت است.<sup>۱</sup> حضور پوسته‌های اپیدرمی آلوده حیوانات در اماکن عمومی می‌تواند یک منبع بالقوه عفونت باشد. بطوری که بیماری می‌تواند از یک شکنندگی جزئی موها همراه با scaling (تجمع سلول‌های اپیدرمی سطحی مرده) تا ضایعات کلاسیک بیماری که بصورت آلپسی‌های گرد، فوکال، مولتی فوکال تا متشر متفاوت باشد. بالطبع بیماری در حیوانات دچار ضعف ایمنی خصوصاً حیوانات دچار بیماری‌های سیستمیک و تضعیف کننده سیستم ایمنی باشد. بیشتری ایجاد می‌گردد و شکل متشر می‌یابد. برای درمان این بیماری در حال حاضر علاوه بر کنترل بیماری‌های زمینه‌ای و شرایط مستعد کننده از دارو‌های مختلفی بشکل موضعی، غوطه وری و عمومی استفاده می‌شود. درماتوفیت‌های مهم آلوده کننده حیوانات، در سه گروه قارچی که بیشترین موارد کلینیکی مربوط به درماتوفیت‌هارا در سگ‌ها و گربه‌ها باعث می‌شوند: میکرو‌سپروم کنیس، میکرو‌سپروم جیپی‌سئوم و تریکووفیتون متاگروفیتیس است.<sup>۱</sup> 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 غیرزنده پوست، مو و ناخن قادر به بقا بوده و عموماً لا یه‌های زنده پوست را مورد تاخت و تاز قرار نمی‌دهند. حیوانات جوان نسبت به بالغین بیشتر مبتلا شده ولی در

پیپت پاستور استریل به سطح کلنی اسپورها آزاد شدند. سوسپانسیون حاصل به منظور حذف ذرات اضافی و قطعات هایی از فیلتر میلیپور (۴۲ میکرون) عبور داده شد.<sup>۵</sup> ماده و ساختار اصلی داروی تربینافین آماده شده از دو مجتمع پارس دارو و پاک دارو تهران تهیه شد و جهت تولید نانوذارو به شرکت نانوزینو ارسال شد.

حیوان آزمایشگاهی: در این مطالعه تعداد ۳۰ عدد خوکچه هندی نر با طیف وزنی یکسان (۳۵۰ تا ۴۰۰ گرم) به مدت یک هفته برای آدپتا سیون در شرایط اوپتیمم (۱۲ ساعت تاریکی در رطوبت ۳٪/۵۰±۳ درجه حرارت ۲۴±۱°C) 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 کف آنها ناحیه‌ای به اندازه ۴ سانتی‌متر مربع تراشیده شده و بو سیله یک سرسوزن، خراشیدگی‌های اندکی (بدون ایجاد زخم) بوجود آمد.

سپس همانصوری که در مطالعات قبلی نیز به آنها اشاره شده است، غلظت ۱۰<sup>۶</sup> عدد اسپور قارچی در هر میلی‌لیتر در ناحیه خراش داده شده قرار داده و توسط واژلین به مدت ۲۴ ساعت بسته شد.

درمان گروه تیمار، هر ۱۲ ساعت یکبار تا بهبودی بالینی و مایکلولوژیک ادامه پیدا کرد. در طول مدت درمان، نانوذارو توسط آب پاش 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 حاشیه ضایعه را نیز پوشش داد. در مراحل پایانی مطالعه به منظور تأیید تاثیر درمان، کشت قارچی انجام پذیرفت. در طول مدت درمان، هر ۵ روز یکبار، عکس برداری انجام گرفته و هر یک از عکس‌ها توسط clinical lesion scoring system درجه بندی شد.

درمان توفیوزیس 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 جداسده از بیمارانی که ضایعه انسانی بوده ولی منع و منشا آن حیوانی است که مبتلا به تریکوفایتون متابگروفایتیس بودند استفاده شد. جهت کنترل و صحت نمونه‌های جدا شده بر روی محیط سابوروود کستروز آگار حاوی سیکلوهگرامید و کلرافینیکل کشت داده شد و محیط کشت ها در دمای ۳۰ تا ۳۵ 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 دسته‌های فراوان میکروکونیدیا است که در انواع حیوان دوست، ایجاد دسته‌های فراوانی از میکروکونیدی های کروی می‌نماید، همچنین از محیط سیب زمینی حاوی دکستروز آگار (PDA) استفاده گردید که در حقیقت پشت کلنی در محیط PDA که ترایکوفایتون متابگروفایتیس کشت داده شد رنگی ایجاد نکرد، همچنین از تست سوراخ موجه تأیید این استفاده شد.<sup>۶</sup>

آماده سازی قارچ بیماریزا و دارو: در این مطالعه علاوه بر نمونه‌های تأیید شده، از سوش‌های استاندارد ATCC18748 توسط شرکت تحقیقاتی و تولیدی آرکاطب روهام (ATR) تهیه گردید. سپس جهت تهیه سوسپانسیون‌های قارچی، ایزوله های تریکوفایتون متابگروفایتیس در محیط PDA داخل لوله کشت داده شدند تا اسپورزا گردید. از کشت‌های تازه ۱۰-۱۴ روزه قارچ ها در حرارت ۲۸ درجه سانتیگراد برای آزمایش استفاده شد. سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۵ درصد توئین ۸۰ به لوله های حاوی کشت ۱۰-۱۴ روزه هر قارچ ریخته شد سپس با مالیدن سوپ پنهانی استریل یا

جدول ۱ - سیستم درجه بندی ضایعات جلدی و پوستی ناشی از ابتلای قارچی تریکوفیتون متاگروفیتس

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

است که اندکی کمتر از گروه های کنترل مثبت می باشد. ضمن اینکه

در جه ضایعات در روز ۲۵ و ۳۰ پس از عفو نت در گروه نانو تربینافین ۱ به پایین ترین score رسید.

بررسی های 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 می دهد( $p < 0.05$ ). همین بررسی نشان می دهد که بین گروه های نانوداروی تربینافین و کنترل مثبت از روز ۲۵ تا پایان درمان اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است( $p < 0.05$ ).

متوسط score در گروه فرم معمول تربینافین ۱ در صد در هنگام آغاز درمان، عدد میانگین ۴/۵ را نشان می دهد که بسیار بیشتر از سایر گروه هاست. تا ۱۰ روز اول این score افزایش شدیدی را نشان داد (بعثت مقاومت دارویی تغییر محسوسی 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 گروه های درمانی فرم معمول تربینافین تنها در روز ۳۵ اختلاف آماری معنی داری داشتند.

مقایسه آماری گروه نانوداروی تربینافین هیچگونه اختلاف آماری معنی داری را نشان نمی دهد و از نظر آماری در هیچ یک از روزها، اختلاف آماری معنی داری با یکدیگر نداشتند و این چنین مقایسه ای بین گروه های فرم معمول تربینافین یک درصد تنها در روزهای ۲۰ و ۲۵ روند افزایشی را نشان داد.

در حالی که در فرم معمول تربینافین تا روز ۱۰ روندی در بهبود مشاهده نشد و بهبودی عالیم از روز ۱۵ اثرات دارو کم تاثیرات خود را اعمال کرد و در روزهای بعدی روند کاهشی آن ادامه پیدا کرد تا اینکه در روز ۴۰ به صفر رسید ( $p < 0.05$ ). مشاهدات صورت

## نتایج

نتیجه بررسی های مرفلوژیک ضایعات که هر ۵ روز بوسیله عکس برداری انجام گرفته است، این تغییرات را به خوبی نشان می دهند. در طول مدت درمان با تربینافین ۱٪ 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 لاحظ شده بود. این در حالی است که عدد درجات ضایعه(score average lesion) در مورد گروه نانو تربینافین ۱ درصد، در مقایسه با فرم معمول دارو این اختلاف معنی دار وجود داشت ( $p < 0.05$ ).

روند کاهش درجه ضایعات در گروه های 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 گروه ها به جز کنترل مثبت score صفر داشتند.

همین بررسی نشان می دهد که گروه نانوداروی تربینافین و کنترل مثبت از روز ۲۵ و ۳۰ تا پایان درمان اختلاف آماری معنی داری وجود داشته است. این در حالی است که فرم معمول داروی تربینافین ۱٪ تنها در روز ۳۵ اختلاف آماری معنی دار دارد( $p < 0.05$ ). 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 می دهند( $p < 0.05$ ).

همین بررسی نشان می دهد 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 ( $p < 0.05$ ). متوسط score در گروه نانو تربینافین یک درصد در هنگام آغاز درمان یعنی روز ۵، ۲/۱۶

بررسی‌های آماری بین گروه لیپوزوم و کترول منفی، اختلاف آماری معنی داری را در همه روزها به جز روز ۴۰ نشان می‌دهند( $p < 0.05$ ). نمونه برداری‌های قارچی در روزهای ۳۷، ۳۰ و ۴۲ نشان دهنده تاثیر یا عدم تاثیر نانو دارو در گروه‌های مختلف است. قطع درمان زمانی انجام شد که حداقل ۲ کشت پشت سرهم در کلیه حیوانات تمام گروه‌ها منفی شد.

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 نانو دارو تربینافین قرار داشتند، از حیوانات گروه تربینافین ۵۰٪ وارد فاز درجه بندی ۴ شده‌اند. در شکل‌های زیر (شماره ۱) نمونه‌ای از تصاویر بهبودی مربوط به هر گروه آمده است و در مورد گروه لیپوزومال (بلانک) از گروه کترول مثبت اندکی کمتر را نشان می‌دهد.



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

DLS تست‌های تاییدیه نانو دارو هستند که توسط شرکت بیم گستر انجام شدند(نمودارهای ۴ تا ۶).

در بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره یا SEM از میکروسکوپ الکترونی که قابلیت عکس برداری از سطوح با بزرگنمایی ۱۰ تا ۵۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر و بسته به نوع نمونه دارد. میکروسکوپ الکترونی روبشی، از مناسب‌ترین و سایل در دسترس برای آزمایش و آنالیز مورفولوژی نانو ساختارها و شناسایی ترکیبات شیمیائی است.

نتایج آنالیزهای تاییدیه نانو داروی تربینافین تو سطح شرکت بیم گسترataban 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 میکروسکوپی SEM- FTIR و آنالیز پتانسیل زتا (ZETA) آزمون dynamic light scattering(DLS) که در SEM-ZETA-(dynamic light scattering) آزمون است: آزمون

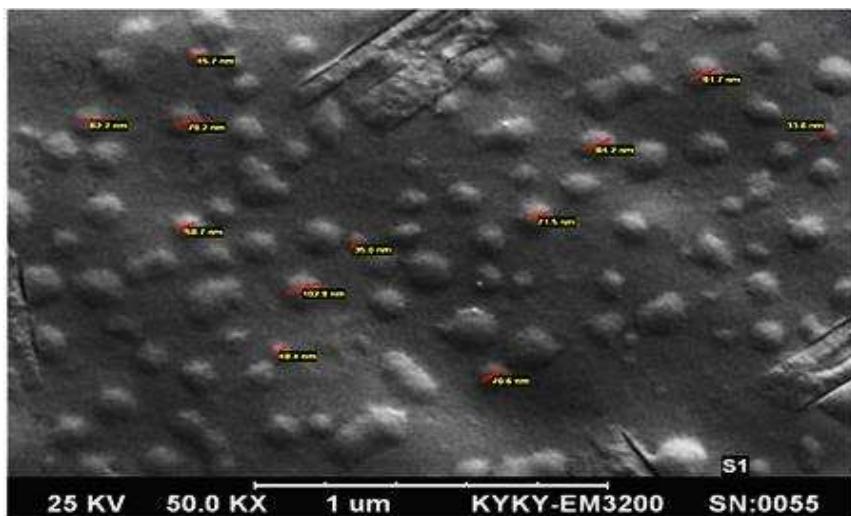
سنگی با مادون قرمز است. در طیف سنجی مادون قرمز، پرتو IR به نمونه برخورد می‌کند. آنالیز پتانسیل زتا به ذره در اکثر موارد به عنوان شاخصی برای بررسی پایداری پراکنده‌گی نمونه مورد استناد واقع می‌گردد. مقادیر بالا از نظر اندازه در پتانسیل زتا (نمودار ۲)، به معنای این است که سوسپانسیون از حیث پایداری الکترواستاتیک در و ضعیت مطلوبی ۱ است. پتانسیل زتا به عنوان تابعی از PH یا به عنوان عاملی در تغییر شیمی نمونه، برای ایجاد فرمولاسیون‌های جدید برای با عمر پایداری طولانی تر می‌باشد. در نقطه مقابل این عمل، مشخص نمودن نقطه‌ای که پتانسیل زتا در آن صفر است و نقطه ایزوالکتریک می‌باشد می‌تواند شرایط بهینه را برای جداسازی ذرات یا ایجاد لخته، فراهم نماید (نمودار ۱).

توانایی SEM برای بررسی سطح مواد بی نظیر بوده و حائز برتری‌های فراوانی نسبت به میکروسکوپ‌های نوری است. در میکروسکوپ نوری تشکیل تصویر با استفاده از نورهای منعکس شده از سطح نمونه صورت می‌گیرد در حالی که در SEM این مهم با بکارگیری الکترون‌ها میسر می‌شود. طول موج الکترون‌ها از فوتون‌های نور کوتاه‌تر بوده و طول موج کوتاه‌تر باعث ایجاد وضوح، قدرت تفکیک و حصول اطلاعات مناسب تر می‌شود. در حقیقت در SEM هیچ سیستم نوری-الکترونی برای تشکیل تصویر و بزرگنمایی وجود ندارد، بلکه تصویر از مشاهده نقطه به نقطه پذیرده‌های سطح متنج از اثر متقابل پرتوی الکترونی با سطح نمونه تشکیل می‌شود.

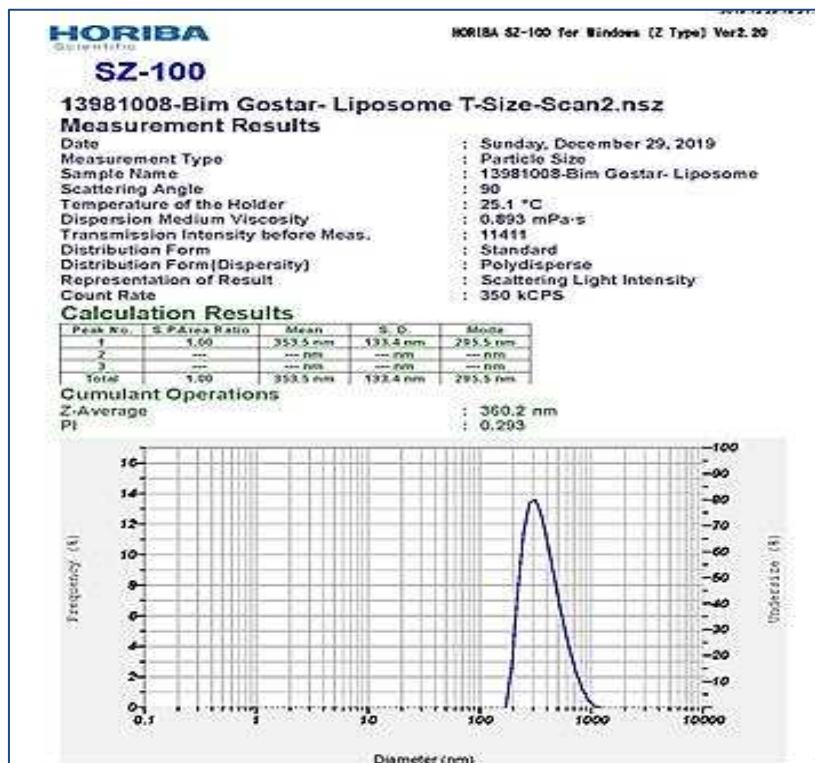
#### آنالیز (Fourier transmission infra-red) FTIR

تبديل فوريه مادون قرمز است که يكى از روش های جديده طيف

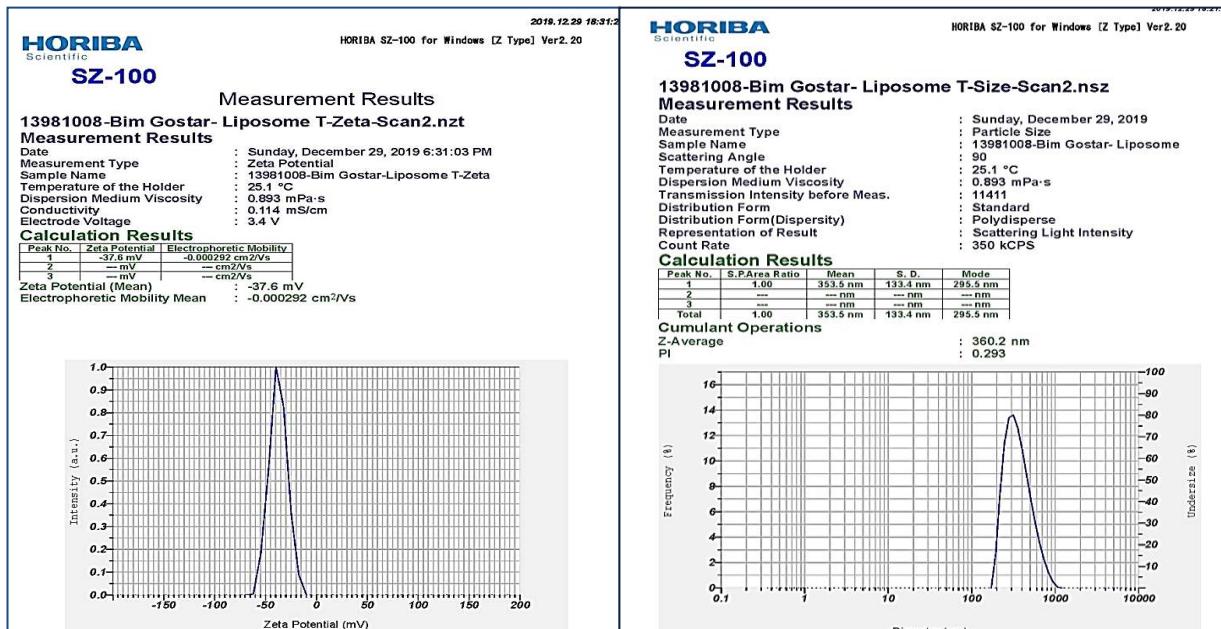
نمودار ۱- آنالیز (طیف سنجی با مادون قرمز)



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو داروی تربینافین فعال

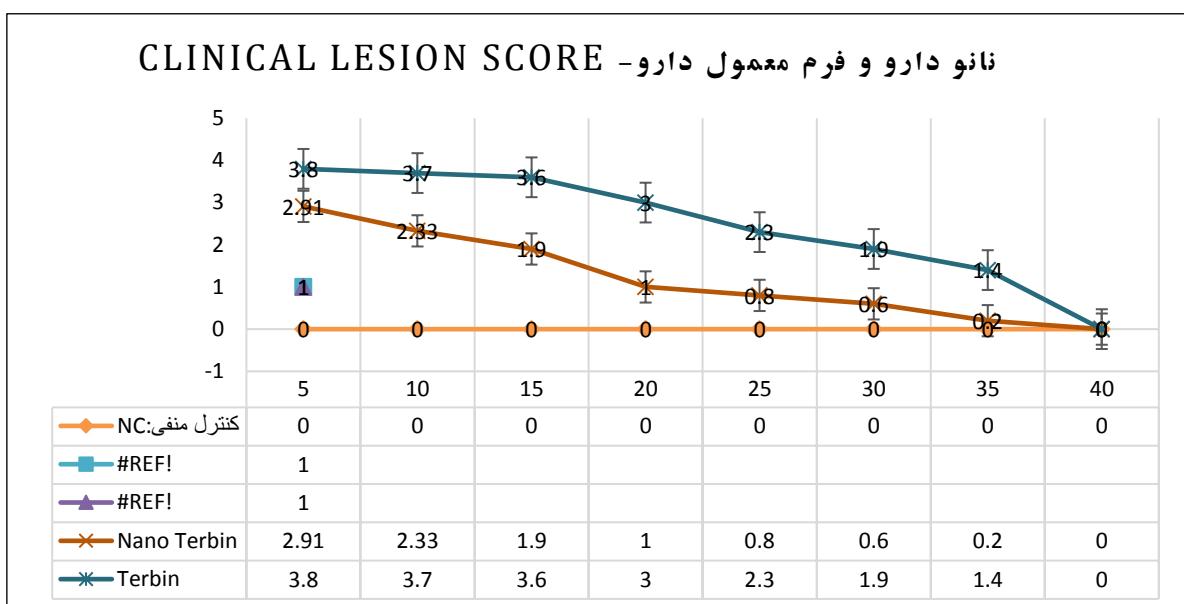


نمودار ۲ - نمودار پتانسیل زتا داروی نانو تربینافین

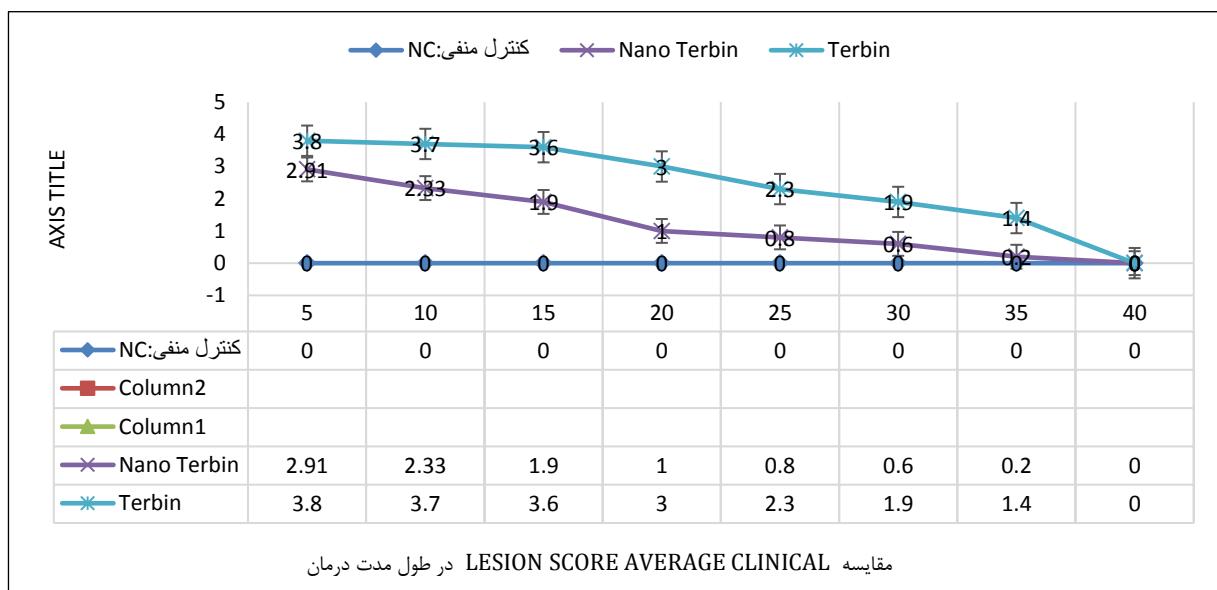


نمودار ۴ - آنالیز پتانسیل زتا (ZETA)

نمودار ۳ - آنالیز DLS



نمودار ۵ - تاثیر نافو داروها در مقایسه با فرم معمول دارو



نمودار ۶ - مقایسه نافو دارو در ضایعات Clinical lesion score average در طول مدت درمان. NC = کنترل منفی،

Liposome ، Nano-Terbin Nano

جدول ۲ - مقایسه نانو دارو در طول مدت درمان.  $Pc$  = کنترل مثبت، NC = کنترل منفی ،  
Liposome ، Nano-Terbin

گروه	روزهای مورد آزمایش							
average/day	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
داروهای تیمار	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
تربینافین	۳/۸	۳/۷	۳/۶	۳	۲/۵	۲	۱/۴	۰
نانو تربینافین	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  $100$  درصد عالایم 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	(۰/۱۰۰)۶/۶	(۰/۸۳/۳)۶/۵	(۰/۸۳/۳)۶/۵
کنترل منفی	(۰/۰)۰/۶	(۰/۰)۰/۶	(۰/۰)۰/۶
تربینافین	۶/۲	۶/۱	(۰/۰)۶/۰
نانو تربینافین	(۰/۱۶)۶/۱	(۰/۰)۶/۰	(۰/۰)۶/۰

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.  
تاكرون داروهای مختلفی برای درمان در ماتوفیتیوزیس آزموده شده‌اند. از بین داروهای عمومی و موضعی آزموده شده، داروهای موضعی به علت جلوگیری از آلوده شدن محیط، اهمیت ویژه‌ای دارند و اساس درمان این بیماری به شمار می‌روند<sup>۶</sup>. به منظور بهبود انتقال داروها از طریق پوست فناوری‌های متنوع شیمیابی و فیزیکی ابداع شده‌اند. یک نمونه از این فناوری‌ها بکارگیری نانو ذرات در دارورسانی است. با توجه به اندازه بسیار کوچک راههای ورود

## بحث

با توجه به شیوع بالای درماتوفیتیوزیس و با در نظر گرفتن درمان مشکل در برخی فرم‌های این بیماری و عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای ضدقارچی، نیاز به جایگزین مناسب با مقاومتهای دارویی ایجاد شده در بیماران ضروری به نظر می‌رسد. به منظور ارزیابی پیش کلینیکی ترکیبات جدید ضدقارچی که می‌توان برای درمان در ماتوفیتیوزیس بکار برد، مطالعات Invivo با استفاده از عفونت‌های تجربی حیوانی در کنار تست‌های حساسیت دارویی روی ایزوله‌های بالینی در *Invitro* ضروری است. شدت عفونت‌های درماتوفیتی در حیوانات آزمایشگاهی و تاثیر درمان

این داروها و کنترل مثبت است که این عدد برای گروه نانودارویی تریینافین ۱٪ کمتر از سایر گروه‌های است، بنابراین کاهش score پس از روز ۲۵ و ۳۰ در گروه نانو تریینافین ۱٪ یک موفقیت در مانی محسوب می‌شود هرچند که اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه نانو دارویی 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 تریینافین ۱٪ افزایش score دیده می‌شود که شاید در روزهای آغازین در مان 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 می‌رسد، 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 تریینافین ۱٪، عدد آغازین average score و روند بهبودی یکسانی را نشان می‌دهند. با در نظر گرفتن همه این تفاوت‌ها که بین فرم معمول و فرم نانو داروها گفته شد، تمامی آنها در روز ۴۰ بهبودی مرغولوژیک داشتند. اما آنچه که این گروه‌ها را از هم متمازیز می‌سازد، نتیجه کشت در اولین نمونه برداری 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 مدل‌های حیوانی انجام گرفته است.

Shimamura و همکاران در سال ۲۰۱۲ در یک مقاله تحلیلی، بطور کامل نحوه ایجاد عفو نت قارچی را مدل حیوانی توضیح داده‌اند. تاریخچه کارهای انجام شده قارچی بر روی مدل حیوانی بوده است مثلاً نحوه تخريش و تلقیح سوسپانسیون قارچی به پوست حیوان بود.<sup>۱۰</sup>

Cavalcanti و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Lee در سال ۲۰۰۲ روش‌های مشابه به آنچه Sakai توضیح داده است برای ایجاد مدل حیوانی استفاده کردند.<sup>۱۱</sup> پیشتر اثرات انسانس گیاه درمنه بر روی

ترکیبات به پوست (کمتر از ۱۰ نانومتر)، برای تهیه فرمولاسیون‌های نانوذرات باید از ترکیباتی استفاده شود که بتوانند به ورود مواد به لایه‌های عمیق‌تر پوست کمک کنند.<sup>۷</sup> ترکیباتی مانند سورفاکانت ها در فرمولاسیون نانو ذرات به عنوان عاملی برای بهینه‌سازی جذب مواد از خلال پوست شناخته شده‌اند. به همین دلیل است که در ساختمان بیشتر نانو ذراتی که قابلیت مصرف موضعی یافته اند (مانند نانوذرات لیپیدی و نانوذرات پلیمری)، از سورفاکانت‌ها استفاده شده است.<sup>۸</sup>

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 تریینافین بر روی مدل حیوانی انجام نگرفته است. تحقیق حاضر برای مقایسه اثرات درمانی نانوداروهای تریینافین ۱٪ با فرم معمول دارو در ترایکوفایتون متابگروفایتیس انجام گرفته است.

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

اگرچه در گروه چهارم (فرم معمول تریینافین 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 می‌شود. مضاف بر اینکه پس از روز ۲۵، میزان کاهش score در گروه نانو داروهای تریینافین ۱٪ و فلوکونازول ۰/۵٪ شبیه تندی می‌گیرد و تا روز ۴۰ به صفر می‌رسد. نکته دیگر مقایسه عدد آغازین score در هنگام شروع درمان در بین گروه‌های تریینافین ۱٪ با نانو داروی

این مطالعه نشان می‌دهد که نانو داروی تربینافین ۱٪ برای درمان درماتوفیتوزیس ناشی از تریکوکاتیون متاگروفایتیس مناسب و از نظر تأثیر درمانی با فرم معمول دارو شدت و سرعت بهبودی قابل قیاس تری دارند. در نهایت با این روش می‌توان نیمه عمر دارو را افزایش و عوارض جانبی و طول دوره درمان را کاهش داد. پیشنهاد می‌شود 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 نانو دارو می‌توان نحوه اثر نانو سانس گیاهی را در شرایط تغذیه‌ای مختلف مدل حیوانی، در مقایسه با سایر داروهای موضعی بررسی 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 راهنمایی‌های کلیه عزیزان (بویژه آقای مجید صادق پور - کارشناس ارشد میکروبیولوژی) که در انجام این پژوهش راهنمایی و مساعدت ارزنده‌ای داشتند کمال تشکر و امتنان را دارم.

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

Chen و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات ضد باکتریال، ضد قارچی، ضد دردی و ضد آیمیابی کامفور را که از اجزای اصلی درمنه است به طور کامل توضیح و اثبات کرده‌اند.<sup>۱۲</sup>

Dash و همکاران در سال ۲۰۱۰ مرور بسیار جامعی بر خواص کیتوسان و تاثیر آن بر Drug delivery system داشته‌اند و کیتوسان را یک پلی الکترولیت 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 کیتوسان در مهندسی 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 به علاوه در سیستم‌های دارو رسانی در بدن در مورد ضد التهاب‌ها، واکسن‌ها، آنتی بیوتیک‌ها، داروهای ضد سرطان و پیتیدها به آسانی استفاده کرد.<sup>۱۳</sup> خصوصیات ذکر شده در مورد کیتوسان توسط سایر محققین<sup>۱۴</sup> نیز بیان و تأکید شده است.

### نتیجه گیری

## References

- Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The Artemisia L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules* 2012;17(3): 2542-66.
- 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.
- Jungerman PF, Schwartzman RM. Veterinary medical mycology1972.
- 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.
- 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.
- 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.
- Scott DW, Miller Jr WH, Griffin CE. Dermatoses of pet rodents, rabbits, and ferrets. Muller & Kirk's Small Animal Dermatology 2001: 1415.
- 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, Motayeden 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<sup>1</sup>, Jamal Hashemi Hazaveh<sup>2</sup>, Mansour Bayat<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PhD student in Veterinary Medicine, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Professor of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

## 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

### \*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