

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

## 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 آلیکس توسط پلی‌مورفونوکلرها 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 (National committee of clinical laboratory standards) NCCLS انجام گرفته است و در آن کمترین غلظت بازدارندگی از رشد (Minimal inhibitory concentration=MIC) و کمترین غلظت کشندگی قارچ (Minimal =MFC fungicidal concentration) دو کمپلکس آزاد کننده [DPTA/NO] (Dipropylena Triamine/Nitricoxide) و [DEA/NO] (Diethylamine nitric oxide) به تنهایی و همراه با کتوکونازول و آمفوتریسین B برای کاندیدا آلیکس، 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 کریپتوکوکوی در تمام گونه‌های تحت بررسی می‌باشد. همچنین استفاده توأم از کمپلکس DPTA/NO در مورد گونه‌های کاندیدا گلابراتا (II) و کاندیدا تروپیکالیس، اثر سینرژیسیم (Fractional inhibitory concentration index=FIX < 0/5) و در مورد کاندیدا آلیکس، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا گلابراتا (I)، اثر additive (FIX < 1/5) نشان می‌دهد. استفاده توأم DPTA/NO و آمفوتریسین B نیز بر ضد کریپتوکوکوس نئوفورمنس، اثر سینرژیسیم (FIX < 0/5) را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: کمپلکس‌های آزاد کننده NO، اثرات ضد کاندیدایی و ضد کریپتوکوکوی داشتند و با داروهای ضد قارچی تداخل اثر به صورت 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.

\*دکتر مهربان فلاحتی I

دکتر محمد شعبانی II

مریم میرمحمدعلی رودکی III

دکتر فرشته جهانبانی IV

کامران پوشنگ باقری V

کلیدواژه‌ها: ۱- نیتریک اکساید (NO) ۲- کمپلکس آزاد کننده NO ۳- ضد قارچ ۴- کاندیدا آلیکس 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<sup>(۱، ۲)</sup>، 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.<sup>(۳، ۴)</sup> 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 میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

کریپتوکوکوس نئوفورمنس به تنهایی و در همراهی با داروهای کتوکونازول و آمفوتریسین B مورد بررسی قرار می‌دهد.

### روش بررسی

گونه‌های کاندیدا شامل کاندیدا آلیکنس (Persian type of culture collection) PTCC(5027) تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس، یک نمونه کاندیدا گلابراتای حساس، یک نمونه کاندیدا گلابراتای مقاوم به کتوکونازول جدا شده از بیماران و یک نمونه کریپتوکوکوس نئوفورمنس می‌باشد. داروهای ضد قارچی شامل پودر کتوکونازول Bath No 50(02-03) اهدایی کارخانه بهوزان رشت، آمفوتریسین B(C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>-A4888) محصول شرکت سیگما و کمپلکس‌های آزاد کننده NO شامل DPTA/NO با فرمول C<sub>6</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> و وزن مولکولی ۱۹/۱۲ دالتون با نیمه عمر ۵ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد که محلول در آب و متانول می‌باشد و DEA/NO با فرمول C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> و وزن مولکولی ۲۲/۲ و ۱۳۲/۱ دالتون با نیمه عمر ۱۶ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد که محلول در آب و متانول می‌باشد، است.

بررسی حاضر یک مطالعه تجربی است. آزمایش در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای و مطابق با استانداردهای National committee of clinical laboratory (NCCLS standards) انجام گرفته است. محتویات هر چاهک شامل ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری تهیه شده در محیط RPMI 1640 در بردارنده ۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر میلی‌لیتر از کشت ۲۴-۱۸ ساعته گونه‌های کاندیدا و ۴۸-۲۴ ساعته گونه کریپتوکوکوس نئوفورمنس و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های سریال دارویی شامل کتوکونازول (۵-۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر)، آمفوتریسین B (۶۴-۰/۰۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کمپلکس‌های آزاد کننده NO (۵-۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود و حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر

ضد توموری و ضد میکروبی از خود نشان می‌دهد<sup>(۱۳)</sup>، به طوری که تحریک ماکروفاژها توسط میکروارگانیزم‌های مختلف نظیر باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و قارچ‌ها منجر به تولید مقدار زیادی NO می‌شود که خاصیت سمی (توکسیسیته) داشته و در نهایت موجب مرگ میکروارگانیزم‌های پاتوژن می‌شود.<sup>(۹-۷)</sup> به همین خاطر مکانیزم‌های وابسته به NO، نقش کلیدی در دفاع میزبان علیه عفونت‌های قارچی ایفا می‌کنند.<sup>(۱۰ و ۱۱)</sup>

در عفونت‌های کاندیدیایی نیز تحقیقات نشان می‌دهد که مکانیزم‌های وابسته به NO، مهم‌ترین راه کشتن کاندیدا آلیکنس توسط پلی‌مورفونوکلئرها (Polymorphonuclear=PMN) می‌باشد.<sup>(۱۴-۱۲)</sup> همچنین در مکانیزم‌های دفاعی بدن علیه کریپتوکوکوس نئوفورمنس، هر چند وجود کپسول پلی‌سارکارید در این مخمر به صورت یک نقاب عمل نموده و سیگنال‌های لازم برای ترشح Tumour necrosis (TNF $\alpha$ ), (Interferone-gamma) INF $\delta$  factor  $\alpha$  که سبب القاء ژن iNOS (inducible Nitric Oxide Syntetase) و تولید NO می‌شوند را کاهش می‌دهد، ولی آمفوتریسین B که داروی متداول در درمان عفونت‌های کریپتوکوکی است با القاء INF $\delta$ ، سبب القاء ژن iNOS و تولید NO به مقدار زیاد شده و اثر ضد کریپتوکوکی ماکروفاژها را افزایش می‌دهد.<sup>(۱۵ و ۱۶)</sup> هر چند مطالب فوق اثرات ضد کاندیدیایی و ضد کریپتوکوکی NO را نشان می‌دهد ولی به علت ناپایداری NO و محدودیت حلالیت آن در محیط‌های آبی، کاربرد مستقیم آن به عنوان یک عامل ضد پاتوژن دچار اشکال شده بود.<sup>(۱۷)</sup> تولید گروه جدیدی از مواد به نام diazonium diolate یا NoNo ates که No را به طور خودبخودی در پاسخ به تغییرات PH محیط و بدون فعال شدن از طریق واکنش‌های Redox و یا انتقال الکترون آزاد می‌کنند، راه را برای مطالعه بیشتر درباره اثرات ضد قارچی NO باز کرد.<sup>(۲۰-۱۸)</sup>

بررسی حاضر پتانسیل ضد قارچی دو کمپلکس آزاد کننده NO را بر روی چند گونه کاندیدا و یک گونه

تروپیکالیس ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا<sup>(۱)</sup> ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا<sup>(۲)</sup> 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)	۰/۶۲۵	۲/۵
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۱۵۶	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 ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا<sup>(۱)</sup> ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و کاندیدا گلابراتا<sup>(۲)</sup> 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	۱۶
کاندیدا گلابراتا(۱)	۴
کاندیدا گلابراتا(۲)	۳۲
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	۱

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 ۲۴ 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.<sup>(۲۴-۲۶)</sup>

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.

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

$$\frac{\text{MIC of Drugs in Combination}}{\text{MIC of Drugs alone}}$$

$FIX < 0.5 =$  synergistic effect

$0.5 < FIX < 1$  additive effect

$1 < FIX < \infty$  indifferent

$FIX > \infty$  antagonistic 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 ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا

کاندیدا گلابراتا<sup>(۱)</sup> ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و کاندیدا گلابراتا<sup>(۲)</sup> ۴ 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) برای کریپتوکوکوس نئوفورمنس شمارش گردید که در جدول شماره ۴، و ۶ موجود می‌باشد. مقادیر FIX بدست آمده برای گونه‌های تحت بررسی در جدول شماره ۷ منعکس می‌باشد.

MIC کمپلکس DPTA/NO در مجاورت با کتوکونازول برای کاندیدا آلبیکنس (5027) PTCC ۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۰۷۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا تروپیکالیس ۰/۰۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کاندیدا گلابراتا<sup>(۱)</sup> ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، و کاندیدا گلابراتا<sup>(۲)</sup> ۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و MIC (5027) PTCC 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 (5027) PTCC ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، کاندیدا تروپیکالیس ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر،

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 کتوکونازول و آمفوتریسین B (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
کاندیدا آلبیکنس (5027) PTCC	۰/۳۱۲	۲	۱/۲۵	۰/۵
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۰۷۸	۲	۱/۲۵	۰/۱۲۵
کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۳۹	۱۶	۱/۲۵	۰/۵
کاندیدا گلابراتا <sup>(۱)</sup>	۰/۶۲۵	۱۶	۱/۲۵	۲
کاندیدا گلابراتا <sup>(۲)</sup>	۰/۳۱۲	۳۲	۲/۵	۴
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۱

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

گونه‌های قارچی	DPTA/NO	۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	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	۰	۳۰۰	۷۰۰	۲۷۰۰	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	"	"	"
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۲۰۰	۲۰۰	۷۱۰۰	۱۵۶۰۰	۱۵۱۰۰	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	"	"	"
کاندیدا تروپیکالیس	۰	۰	۴۰۰	۱۵۰۰	۱۲۳۰۰	۵۱۰۰۰	غیر قابل شمارش	"	"	"
کاندیدا گلابراتا <sup>(۱)</sup>	۰	۲۰۰	۱۲۰۰	۲۵۳۰۰	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	"	"	"	"
کاندیدا گلابراتا <sup>(۲)</sup>	۰	۸۰۰	۵۳۰۰	۲۸۴۰۰	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	"	"	"	"

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

گونه‌های قارچی		رشتهای سریال کمپلکس DPTA/NO		۰/۰۱۹	۰/۰۲۹	۰/۰۷۸	۰/۱۵۶	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵
				میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
کاندیدا آلیکنس(5027)PTCC				۰	۰	۰	۳۰۰۰	۱۳۰۰	۷۰۰	۲۰۰	۰
شمارش		شمارش		غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل
کاندیدا پاراپسیلوزیس				۰	۰	۰	۱۰۳۰۰	۲۵۰۰	۱۶۰۰	۰	۰
شمارش		شمارش		غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل
کاندیدا تروپیکالیس				۰	۰	۰	۱۲۰۰	۴۰۰	۳۰۰	۰	۰
شمارش		شمارش		غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل
کاندیدا گلابراتا <sup>(۱)</sup>				۰	۰	۰	۲۶۹۰۰	۹۴۰۰	۳۶۰۰	۰	۰
شمارش		شمارش		غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل
کاندیدا گلابراتا <sup>(۲)</sup>				۰	۰	۰	۳۱۸۰۰	۲۸۵۰۰	۲۷۳۰۰	۱۶۵۰۰	۳۶۰۰
شمارش		شمارش		غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل

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

گونه قارچی		رشتهای سریال کمپلکس DPTA/NO		۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۹	۰/۰۱۹	۵-۰/۰۳۹
				میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
تعداد کلونی در رفتهای کمپلکس DPTA/NO به تنهایی				۰	۰	۰	۲۶۴۰	۱۲۵۰	۷۹۰۰	۱۵۰	۰	۰
شمارش		شمارش		غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل
تعداد کلونی در رفتهای کمپلکس (آمفوتریسین B + DPTA/NO)				۰	۰	۰	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰
شمارش		شمارش		غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل	غیرقابل

### 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.<sup>(۲۵)</sup> امروزه اطلاعات وسیعی در مورد نقش فیزیولوژیک و سیتوتوکسیک NO وجود دارد.<sup>(۲۶)</sup> نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کمپلکس DPTA/NO دارای فعالیت ضد کاندیدایی و ضد کریپتوکوکوس 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<sup>(۲)</sup> جدا شده از بیمار و مقاوم به درمان با دارو، کمترین میزان حساسیت را نسبت به مولکول NO دارد. همچنین استفاده توأم از کمپلکس

جدول شماره ۷- مقدار FIX برای گونه‌های قارچی تحت بررسی

گونه‌های قارچی	مقدار FIX (میکروگرم در میلی‌لیتر)
کاندیدا آلیکنس(5027)PTCC	۰/۹۹
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۰/۷۵
کاندیدا تروپیکالیس	۰/۰۶
کاندیدا گلابراتا <sup>(۱)</sup>	۱
کاندیدا گلابراتا <sup>(۲)</sup>	۰/۲۴
کریپتوکوکوس نئوفورمنس	$۸/۲ \times 10^{-2}$

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.

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.<sup>(۳۰)</sup> در ضمن برای استفاده سیستمیک از این کمپلکس‌ها باید بتوان حق‌المقدور کمپلکس‌های فعال شده را مستقیماً به ارگان‌سیم 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<sup>(۳۱ و ۳۲)</sup>، 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

DPTA/NO و کتوکونازول در مورد گونه‌های کاندیدا گلابراتا<sup>(۳)</sup> و کاندیدا تروپیکالیس، اثر synergism ( $FIX < 0.5$ ) و در مورد کاندیدا آلیکسنس (PTCC 5027) و کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا گلابراتا<sup>(۱)</sup>، اثر additive ( $FIX < 0.5$ ) را نشان می‌دهد. استفاده توأم از DPTA/NO و آمفوتریسین B در مورد کریپتوکوکوس نئوفورمنس نیز اثر synergism ( $FIX < 0.5$ ) را نشان می‌دهد. در استفاده همزمان NO و کتوکونازول در مورد سوش کاندیدا گلابراتا<sup>(۳)</sup> 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<sup>(۱)</sup> 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 توأم 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.<sup>(۳۰-۳۲)</sup>

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

10- Kadeken N, Kawakami K, Saito A. Different susceptibilities of yeasts and candida of penicilium marneffeii 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, Restrepo 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. Peroxynitrite 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. Involvement of nitric oxide in protecting mechanism during experimental cryptococcosis. Clin Immunol 1999 Feb; 90(2): 256-65.

16- M Tohyama, K kawakami, A Saito. Anti cryptococcal 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.

این بررسی اثر تداخلی دارند که بسته به گونه‌های مورد بررسی، به صورت‌های مختلف می‌تواند 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 آذانبور 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, Veeranjana 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 systostasis 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 Applied Microbiol 2001; 90(4): 648.

- 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 combination 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.



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

<sup>I</sup> \*M. Falahati, PhD    <sup>II</sup> M. Shabani, PhD    <sup>III</sup> M. Mirmohammadali Roodaki, MS  
<sup>IV</sup> F. Jahanbani, PhD    <sup>V</sup> K. Pooshang Bagheri, MS

*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 anticytococtal 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.