تأثير العقار صوديوم نايتروبروسيد المثبط لنمو خميرة *Candida albicans*

محمد خالد شندالة محمد بشير إسماعيل قاسم طه عبد الوهاب خميس

قسم الأدوية قسم علوم الحياة

فرع الفسلجة/كلية الطب البيبطري كلية التربية

جامعة الموصل

تاريخ الاستلام تاريخ القبول

2006/03/28 2006/12/05

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) has been recently recognized as a major mediator of resistance against fungus infection. Therefore, we investigated the effect of the pharmacological compound (Na nitroprusside) (SNP) as the NO donor on the in vitro growth of *Candida albicans* . The results of present study revealed that Na nitroprusside (NO donor) inhibited the *C. albicans* growth in a concentration - dependent manner, maximal inhibition concentration was observed in (SNP) with concentration (17.5mg/ml from growth media), there was complete inhibition of *C. albicans* growth occurs in comparison with the control without (SNP) .On other hand the addition (SNP) at concentration ranged from (10- 15mg/ml from growth media) capable of restricting the growth of C. albicans . In contrast, no *C. albicans* growth inhibition occurs when (SNP) addition at concentration ranged from (0.625-7.5mg/ml from growth media) . The data suggest that the pharmacological compound (SNP) may be useful in the development of new therapeutic agents for treatment of *Candida* infections.

الخلاصة

تبين حديثا أن النتريك أوكسيد (NO) من الوسائط الأساسية في الآلية الدفاعية ضد الاصابة بالفطريات .ولكون العقار صوديوم نايتروبروسيد مانحا لجزيئة النتريك أوكسيد (NO) كان الهدف من الدراسة الحالية هو اختبار تأثير جزيئة (NO) المتحررة من العقار في نمو *C. albicans* (خارج الجسم الحي) . لقد أظهرت نتائج الدراسة أن صوديوم نايتروبروسيد المانح لجزيئة (NO) قد ثبط نمو *C. albicans* وعلى نحو يعتمد على التركيز ، فقد كان التركيز المثبط من العقار صوديوم نايتروبروسيد هو (17.5 ملغم/مل من وسط النمو) أذ ثبط هذا التركيز نمو *C. albicans* على نحو

كبير بالمقارنة بمجموعة السيطرة (غير المعاملة بالمركب الدوائي) . في حين أدت اضافة المركب صوديوم نايتروبروسيد وبالتراكيز (10–15 ملغم /مل من وسط النمو) الى أحداث أعاقة في نمو *C. albicans* . وعلى النقيض من ذلك لم يحدث تثبيط لنمو *C. albicans* عند التراكيز (0.625 – 7.5 ملغم /مل من وسط النمو) . وبناء على نتائجنا الحالية نقترح أمكان الاستفادة من العقار (صوديوم نايتروبروسيد) في تطوير أدوية حديثة لعلاج الاصابة *C. albicans* .

المقدمة

تتواجد خميرة *Candida albicans* بصورة طبيعية في الفم والقناة الهضمية و القناة التناسلية ، وهي من الخمائر الممرضة الانتهازية(Opportunistic pathogen) التي تصبح ممرضة في الأشخاص الذين يعانون من اختلال في الجهاز المناعي أو الذين يعالجون بالمضادات الحياتية الواسعة الطيف (1) . أن حساسية هذه الخمائر للأدوية المضادة للفطريات قد أخذت حيزا واسعا من الاهتمام وذلك لظهور عزلة مقاومة لهذه الأدوية (3,2) مما دعا الى اكتشاف أنواع جديدة من المركبات الدوائية للتغلب على هذه المقاومة ومن ثمة فان استخدام الاختبارات الخاصة خارج الجسم الحي (In vitro) لفحص التأثيرات المضادة للفطريات للمركبات حديثة يعد من الخطوات المهمة على طريق اكتشاف مركبات جديدة للتغلب على ظاهرة المقاومة للمضادات الفطرية .

أشارت الدراسات الحديثة الى امتلاك جزيئة النيتريك أوكسيد (NO) تأثيرات مضادة للفطريات (5,4) . وقد توصل (Rodriguez et al, 2003, Gonzalez etal,2000) الى أن الجهاز المناعي للمصاب سوف يقاوم هذه الفطريات خلال الاصابة الطبيعة بها وذلك عن طريق (NO) المنتج من البلعميات المحفزة خلال الاستجابة المناعية ضد الفطريات أي أن (NO) هو المسؤول الرئيسي عن المقاومة ضد الفطريات أن هذا الاستنتاج الذي توصلت اليه الدراسات الحديثة بشأن دور (NO) في مقاومة الفطريات قد أكد ما أشارت اليه الدراسات السابقة بشأن أنتاج البلعميات للنيتريك أوكسيد (8). كما توصل(Elahi et al,2001) الى أن (NO) الموجود في اللعاب يؤدي دورا في المقاومة الطبيعية ضد خميرة *candida albicans* التي تصيب التجويف الفمي . وتمتلك جزيئة (NO) خواصا فيزيائية وكيميائية مميزة اذ تعد من اصغر الوسائط البيولوجية الجزيئية وذلك لامتلاكها وزنا جزيئيا صغيرا قدره (30) كما تمتلك درجة ذوبان عالية في الدهن High lipid solubility وبذلك يمكن أن تعبر الغشاء الخلوي بسهولة وان تصل الى أي جزء في خلية الميكروبية Microbial cell(10)

ويرى الدارسون أن الية عمل (NO) بوصفه مثبطا لنمو الخمائر تعود الى تداخله في وظيفة مجموعات الثايول الخاصة بالارتباط بالنحاس (Copper- binding thiols) الموجودة في بروتينات الجين المنشط للاستنساخ (Transcriptional activator acel) في الخمائر مؤديا الى

تحوير هذهالمجموعات ثم عدم قدرتها على الارتباط بمعدن النحاس وإن إزالة تمعدن ألجين Acel (Demetallated Acel) ينتج عنها تحلل لبروتينا ت الجين المنشط مؤديا الى تثبيط في نمو الخميرة (11) .

يستخدم المركب الدوائي صوديوم النايتروبروسيد في علاج الحالات الطارئة من أرتفاع ضغط الدم (Hypertensive emergencies) (13,12). ويعد هذا المركب مانحا قويا لجزيئه النتيريك أوكسيد (NO donor) (15,14) . وبناء على ما ذكر سابقا من امتلاك (NO) تأثيرات مضادة للفطريات كان الغرض من الدراسة الحالية هو اختبار فعا لية جزيئه (NO) المتحررة من الصوديوم النايترو بروسيد في تثبيط نمو خميرة *C. albicans* (خارج الجسم الحي) .

المواد وطرائق العمل

1- تحضير خميرة *Candida albicans*

استخدمت في هذا البحث الخميرة المرضية *C. albicans* التي تم الحصول عليها من مختبرات بحوث الأحياء المجهرية / كلية العلوم/ قسم علوم الحياة/جامعة الموصل .

2-اختبار الفعالية البايولوجية للمركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد في نمو خميرة *C. albicans*

اختبر تأثير المركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد في نمو خميرة *C. albicans* بحسب طريقة (Pershen, 1971.)وذلك بتحضير وسط أكار السابرويد المعد للاختبار واضافة تراكيز مختلفة اليه من المركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد اذ تدرجت هذه التراكيز كالأتي (0.625 , 1.25, 2.5, 5 , 7.5, 10 , 12.5 , 15 , 17.5ملغم/مل من وسط أكار السابرويد) وقد حضرت هذه التراكيز باضافة أحجام معينة من المركب في 5مل من الماء المقطر المعقم (يذوب مركب صوديوم نايتروبروسيد سريعا في الماء (13) لذلك استخدم الماء المقطر بوصفه مذيبا) ثم أضفيت هذه الـ 5 مل من الماء المقطر المحضر والحاوي على أحجام معينة من المركب الدوائي الى 45ml من وسط أكار السابرويد المعقم قبل تصلبه في دورق سعته 100مل تحت ظروف معقمة للحصول على التركيز السابقة الذكر ما عدا مجموعة السيطرة التي حضر الوسط فيها باضافة الـ 5 مل من الماء المقطر فقط (من دون اضافة المركب الدوائي أليه) الى 45 من وسط أكار السابروید، ثم رجت هذه القوارير جيدا ليتجانس تركيز المادة الفعالة مع الوسط بعد ذلك صبت في أطباق بتري (قطر 9سم) بحيث احتوى كل طبق على 15مل من الوسط الزرعي وبواقع (ثلاث مكررات لكل تركيز) وبعد تصلبه ، أخذ معلق من مزرعة حديثة للخميرة *C. albicans* و ضبط عدد الخلايا الحية بمعدل 1000خلية/0.1 مل من اللقاح الحديث التحضير اذ لقح سطح الوسط الزرعي للأطباق جميعا ولكل من التراكيز المدروسة وذلك عن طريق اضافة 0.1 مل من اللقاح الى كل طبق وباستخدام الماصة

الدقيقة (Micropipet) ثم نشر على سطح الوسط باستخدام ناشرة (Spreader) معقمة ثم ترك الوسط عدة دقائق ليتشرب باللقاح ثم وضعت الأطباق الملقحة في الحاضنة عند درجة حرارة $35°C \pm 1$ مدة ثلاثة أيام وبعد الانتهاء من مدة التحضين سحبت الأطباق من الحاضنة لقراءة النتائج اعتمادا على درجة نمو الخميرة .

النتائج

تبين من نتائج الدراسية الحالية أن المركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد المانح للجريئة النيتريك أوكسيد (NO) كان ذا تأثير مثبط لنمو خميرة *C.albicans* (Candidostatic effects) وبنسب متفاوتة وعلى نحو يعتمد على التركيز Concentration – dependent manner وكالاتي .

كان التركيز الذي يظهر أعلى تثبيط لنمو الخميرة (Maximal inhibition concentration) من المركب الدوائي هو (17.5ملغم /مل من وسط النمو)فقد ثبط كليا هذا التركيز نمو الخميرة (−) على وسط أكار السابرويد مقارنة بمعاملة السيطرة وبالتراكيز (10 − 15 ملغم /مل من وسط النمو) (±) و (1.25 − 7.5ملغم /مل من وسط النمو) (+) و (0.625 ملغم/مل من وسط النمو) (++) و كما موضح في الشكل(4) والجدول (1).

في حين أدى حضن الخميرة *C.albicans* مع المركب الدوائي الصوديوم نايتروبروسيد وبتراكيز (10−15 ملغم /مل من وسط النمو) الى حدوث إعاقة في نمو الخميرة (±) تميز في الانخفاض الواضح في حجم المستعمرات الخميرة وعددها مقارنة بنمو مستعمرات الخميرة على وسط أكار السابرويد لمعاملة السيطرة وبا لتراكيز (1.25 − 7.5ملغم /مل من وسط النمو) (+) و (0.625 ملغم/مل من وسط النمو) (++) و كما موضح في الشكل(3) والجدول (1).

ومن جهة أخرى فقد أدى حضن الخميرة *C.albicans* مع المركب الدوائي الصوديوم نايتروبروسيد وبتراكيز (1.25 − 7.5 ملغم /مل من وسط النمو) الى أحداث نمو (+) لايختلف كثيرا عن م عاملة السيطرة ومن الجدير بالذكر أن نمو مستعمرات الخميرة عند التركيز الواطئ جدا (0.625ملغم /مل من وسط النمو) (++) قد كان بدرجة اكبر من السيطرة مما يدل على ان الصوديوم نايتروبروسيد ولاسيما بالتراكيز الواطئة جدا قد يكون محفزا للنمو وكما موضح في الشكل(2) والجدول (1) .

المناقشة

أشارت الدراسات الحديثة الى امتلاك النتيريك أوكسيد (NO) تأثيرات مضادة للفطريات (4, 5) والى كون المركب الدوائي الصوديوم نايتروبروسيد مانحا قويا لجزيئة النتيريك أوكسيد (NO) (15,14) لذلك كان الغرض من الدراسة الحالية معرفة فعالية جزيئه (NO) المتحررة من الصوديوم نايتروبروسيد في تثبيط نمو الخميرة *C. albicans* . تبين من نتائج دراستينا الحالية أن المركب الدوائي الصوديوم نايتروبروسي د المانح للجريئة (NO) كان ذا تأثير مثبط لنمو خميرة *C.albicans* وقد يعزى السبب من هذا التثبيط في نمو الخميرة عند حضانتها مع تراكيز مختلفة من المركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد الى من حه جزيئة (NO) (15,14) ولعل الية عمل (NO) بوصفه مثبطا لنمو الخمائر تعود الى تداخله في وظيفة مجموعات الثايول الخاصة بالارتباط بالنحاس (Copper- binding thiols) الموجودة في بروتينات الجين المنشط للاستنساخ الموجودة في الخمائر ، اذ تؤدي هذه المجموعات دورا مهما جدا في ايض معدن النحاس في الخمائر (مثل عمليات نقل معدن النحاس وحجزه وأخذه واستخدمه) ، وتعد مجموعات الثايول الهدف الر ئيسي لجريئة (NO) ، فعند ارتباط (NO) بمواقع الثايو ل الخاصة بارتباط معدن النحاس تحور هذه المجموعات وتنعدم قدرتها على الارتباط بمعدن النحاس ، أن عدم ا رتباط النحاس بمواقع الثايول الموجودة في الجين سوف يؤدي الى ازالة تمعدن الجين Acel مما ينتج عنه تحلل لبروتيناته ثم تثبط نمو الخميرة (11). كما يمكن أن يعزى السبب في تثبيط نمو الخميرة *C. albicans* بوساطة المركب الدوائي صوديوم النايتروبروسيد المانح للجزيئة NO الى قدرة NO على تثبيط الأنزيمات الايضية الموجودة في الخميرة مؤديا الى تثبيط في نمو الخميرة(10).

كان تثبيط المركب الدوائي صوديوم النايتروبروسيد المانح للجزيئة (NO) في الدراسة الحالية معتمدا على نحو رئيسي على التركيز ، فقد كان أعلى تركيز مثبط وعلى نحو كبير لنمو الخميرة هو (17.5ملغم /مل من وسط النمو) اذ اختفت وعلى نحو كبير المستعمرات الخميرة على وسط أكار السابروي مقارنة مع التر اكيز الاخرى (0.625 , 1.25, 2.5, , 5 , 7.5, 10 , 12.5 , 15 ملغم/مل من وسط أكار السابروي) وقد جاءت هذه النتيجة متفقة مع الدراسات السابقة (11,7) بشأن وجود علاقة طردية مابين مستويات (NO) ودرجة تثبيط النمو للفطريات وبناء على هذا الاستنتاج فان زيادة تركيز المركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد المانح للجزيئة (NO) سوف تزيد من مستويات هذه الجزيئة وذلك لتحرره بكميات اكبر من المركب الدوائي نتيجة لزيادة تركيزه مما يؤدي الى تعرض الخميرة الى مستويات عالية من (NO) المتحرر من المركب الدوائي ومحدثا بذلك تأثيرات مثبطة لنمو الخميرة ولاسيما عند التراكيز العالية .

ومن جهة أخرى أدى حضن الخميرة عند تراكيز واطئة جدا(0.625 ملغم/مل من وسط النمو) من المركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد المانح لجزيئه (NO) الى أحداث تحفيز في نمو الخميرة مقارنة بالتراكيز الأخرى وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ما توصل إلية حديثا (Ullmann et al .,

2004) من أن عند تعريض *C. albicans* الى مستويات واطئة جدا من جزيئه(NO) سوف يؤدي الى زيادة في تحفيز ألجين المنشط (Ca YHBI/ Promoter) الموجود في الخميرة أذ يدخل هذا الجين المنشط في تضاعف DNA مؤديا الى تحفيز نمو الخميرة مما يفسر التحفيز الواضح في دراستنا الحالية لنمو خميرة *C. albicans* عند حضانتها مع صوديوم نايترو بروسيد المانح (NO) بالتركيز الواطئ جدا (0.625ملغم /مل من وسط النمو) أذ تحررت مستويات قليلة من (NO) أدت الى تحفيز نمو الخميرة .

لقد أكدت نتائج الدراسة الحالية بشأن تأثيرات صوديوم النايتروبروسيد المانح للجزيئة (NO) المثبطة لنمو خميرة *C.albicans* التي أجريت خارج الجسم الحي ما توصلت اليه الدراسات السابقه التي أجريت داخل الجسم الحي (In vivo) من أن NO المنتج م ن البلعميات المحفزة نتيجة الاستجابة المناعية ضد الخمائر هو المسؤول الرئيسي عن المقاومة ضد الخمائر (8 ,7,6) .

لقد أظهرت الدراسة الحالية فعالية العقار صوديوم نايتروبروسيد المانح للجزيئة النتيريك أوكسيد (NO) في تثبيط نمو خميرة *C.albicans* . وبناء على هذه النتائج الحالية نقترح أمكا ن الاستفادة من المركب الدوائي (صوديوم نايتروبروسيد) في تطوير أدوية حديثة لعلاج الاصابة *C. albicans* .

المصادر

1- Prescott LM., Harley J P. and Klein DA .," Microbiolology" . 6 th ed . Mc Graw – Hill Companies . New York ., p 796-797 (2005).

2-Vazquez JA., Lynch M.and Sobel JD ., "In vitro activity of a new pneum ocandin antifungal agent, L- 733,50,against azole – susceptible and resis – tant *Candida* and *Torulopsis* species" . Antimicrob . Agents Chemother ., 39:2689 – 2691 (1995).

3- Bosseche VH., Warnock DW., Dupont B., Kerridge D.,Gupta SS., Impro visi L.,Marichal P., Odds FC., Provost F., and Ronin O.,"Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance". J.Med.Vet.Mycol., 32: 189-202 (1994) .

4-Rang H P., Dale M M., Ritter J M., and Moore PK., "Pharmacology"., 5th ed., Bath Press,UK.p.212-213 (2003).

5- Degroote MA., and Fang FC ., "Antimicrobial properties of nitric ox ide" p. 231-261. In Fang FC (ed), Nitric oxide and infection. Kluwer Academic /Plenum., New York (2000).

6- Rodriguez MC.,Sotomayor C.,Costamagna ME.,Cabanillas AM.,Renteria BS.,Masini- Repiso AM., and Correa S.," Immunocompetence of macrop-hages in rats exposed to Candida albicans infection and stress" . Am . J .Ph-ysiol ., 284:C 111-118 (2003) .

7-Gonzalez A.,Gregori W D.,Velez D., Raestrepo A .,and Cano LE., "Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon activated murine macrophages against Paracoccidioides brasiliensis Conidia" Infection and Immunity ., 68 : 2546 – 2552 (2000) .

8- MacMicking J., Xie Q.,NathanC.," Nitric oxide and macrophage function" Annu.Rev. Immunol., 15:323-350 (1997) .

9- Elahi S., Pang G., Ashman RB., and Clancy R ," Nitric oxide –enhanced resistance to oral candidiasis" .Immunology., 104:447-454 (2001) .

10- Fang FC. "Mechanisms of nitric oxide related antimicrobial" . J .Clin . Invest ., 99: 2818-2825(1997) .

11- Shinyashiki M. , Chiang K T., Switzer C H., Gralla E B., Valentine J S., Thiele D J., and Fukuto J M ., "The interaction of nitric oxide (NO) with the yeast transcription factor Acel:A model system for NO – protein thiol interaction with implication to metal metabolism".PNAS., 97:2491-2496 (2000) .

12- Hardman JG., and Limbird LE.,. "Goodman and Gilman's .The Pharmacological Basis of Therapeutics"- 10th Ed**.** The McGraw-Hill Companies, Inc., p. 889-890 (2001).

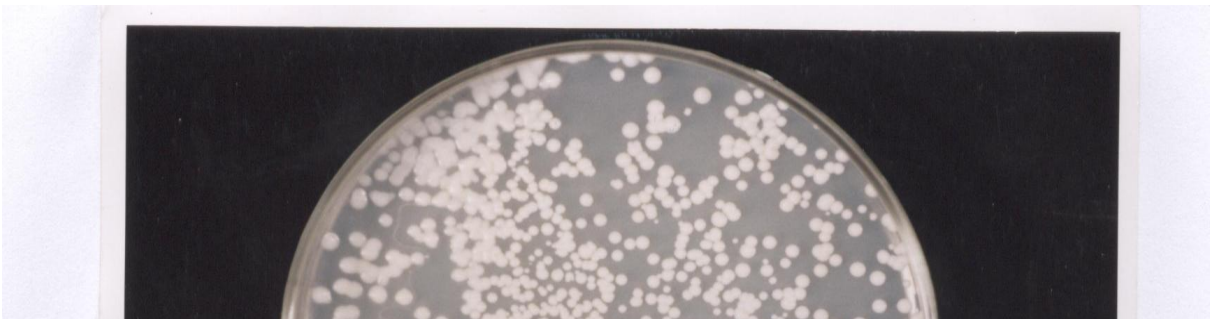
13-Sweetman SC., Martindale The Complete Drug Reference, published by the Pharmaceutical press, publication division of the Royal Pharmaceutical society of Great Britain, gastrointestinal drug Pharmacokinetics ., p . 1001(2002) .

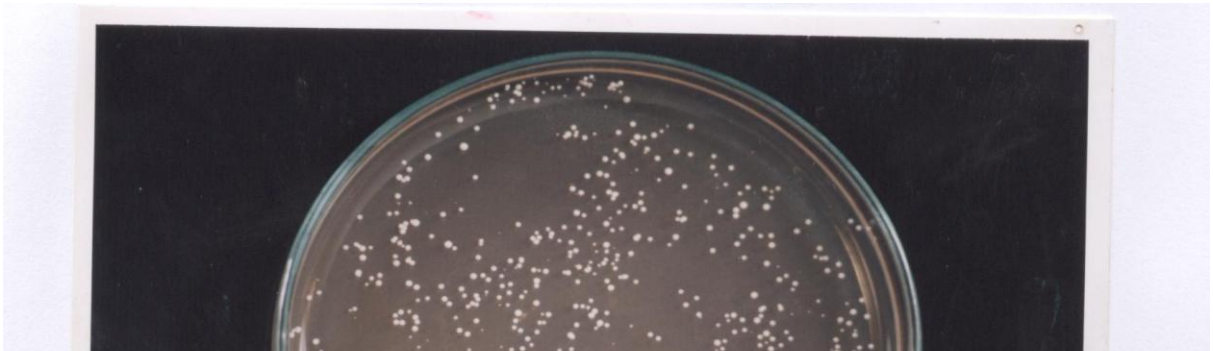
14-Ignarro L J., Napoli C., and Loscalzo J.," Nitric oxide donors and cardio vascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide.Circulation Research ., 90: 21(2002) .

15- Megson IL ., . "Nitric oxide donor drugs" . Drugs of Future., 25: 701-715 (2000).

16- Pershen KN., "Experimental methods of Chemotherapy". MockBa Medicine., . p.429 (1971) (In Russian).

17- Ullmann BD., Myers H., Chiranand W., Lazzell AL., Zhao Q.,Vega LA., Lopez-Ribot JL., Gardner PR., and Gustin MC., " Inducible defense mechanism against nitric oxide in Candida albicans" .Eukaryotic Cell .,3:715 -723 (2004) .





الجدول (1) : يوضح تأثير المركب الدوائي صوديوم نايتروبروسيد في نمو خميرة *Candida. albicans* .على وسط أكار السابرويد .

تركيز المركب الدوائي صوديوم نايترو بروسيد (ملغم /مل من وسط النمو)	درجة نمو الخميرة *C. albicans* على وسط أكار السابرويد
0 (السيطرة)	+
o.625	++
1.25	+
2.5	+
5	+
7.5	+
10	±
12.5	±
15	±
17.5	–

<+> : نمو الخميرة بشكل طبيعي (السيطرة) .

<++> : نمو الخميرة بشكل كثيف جدا (زيادة في حجم مستعمرات الخميرة وعددها مقارنة بالسيطرة)

<±>:إعاقة في نمو الخميرة.(انخفاض في حجم مستعمرات الخميرة وعددها مقارنة بالسيطرة)

<–> : تثبيط كليا لنمو الخميرة .