مقاله پژوهشی

مقایسه اثر درمان ضد کریپتوسپوریدیائی نانوداروی نیتازوکسانید با داروی آزاد در نوزاد موش

فروزان صدیقی*، دکتر رقیه عباسعلی پورکبیر**، دکتر امیرحسین مقصود***، دکتر محمد فلاح****

دریافت: ۹۴/۱۰/۲ پذیرش: ۹۵/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: کریپتوسپوریدیوزیس بیماری انگلی است که انتقال آن به صورت مدفوعی- دهانی، تماس مستقیم یا غیرمستقیم و یا از طریق مواد غذایی یا نوشیدنی صورت می گیرد. درمان آن دشوار بوده و داروهای ضدانگل موجود بر روی آن تاثیر چندانی ندارند. هدف مطالعه حاضر کپسوله نمودن داروی نیتازوکسانید در نانو ذرات جامد لیپیدی و بررسی اثر آن در مقایسه با شکل آزاد دارو در نوزاد رت بود.

روش کار: داروی نیتازوکسانید به روش high pressure homogenization (HPH) با غلظت 2 mg/kg در نانو ذرات solid lipid nanoparticles (SLN) کپسوله گردید. اواوسیست‌ها از نمونه‌های مدفوع اسهالی گوساله‌های جوان جمع آوری و به روش شناور سازی با محلول ساکارز ۵۵ درصد تخلیص گردید. ۷۲ نوزاد رت ویستار ۲ الی۳ روزه در۶ گروه دوازده تایی شامل موش‌های آلوده تحت درمان با داروی آزاد، تحت درمان با نانو داروی کپسوله شده، تحت درمان با حامل کلوئیدی فاقد دارو(SLN)، تحت اثر روغن زیتون، موش‌های آلوده شدهٔ گروه شاهد و موش‌های سالم فاقد آلودگی تحت اثر بافر فسفات تقسیم گردید. تعداد ۵×۱۰^{۵} اواوسیست از راه خوراکی به گروه‌های نمونه تلقیح شد. در پایان، روده هریک از موش‌ها هموژنیزه و هموژنیزات پس از صاف کردن با روش فلوتاسیون اواوسیست های موجود در هر نمونه شمارش گردید.

نتایج : درمان با داروی نیتازوکسانید سبب کاهش معنی‌دار تعداد انگل‌ها در گروه‌های تیمار شد که این کاهش در روز ششم بعد از تیمار نسبت به روز سوم بیشتر بود. نانوداروی نیتازوکسانید نسبت به داروی آزاد میزان انگل‌ها را بیشتر کاهش داده بود. این تفاوت در روز سوم پس از درمان، معنی دار نبود($P= 0.182$) اما در روز ششم از نظر آماری معنی‌دار بود ($P< 0.001$).

نتیجه‌نهایی: استفاده از نانو داروی نیتازوکسانید می‌تواند روش موثرتری از شکل آزاد این دارو برای درمان کریپتوسپوریدیوزیس باشد.

کلید واژه ها: کریپتوسپوریدیوم / نانو دارو / نیتازوکسانید

مقدمه:

تک‌یاخته کوکسیدیایی کریپتوسپوریدیوم جزو شایع‌ترین تک‌یاخته‌های بیماریزای روده‌ای در انسان است که می‌تواند باعث مرگ در افراد دچار نقص ایمنی شود (۱).

در ابتدا باور بر این بود که این تک‌یاخته فقط یک عامل فرصت طلب در افرادی است که در تماس با حیوانات آلوده قرار می‌گیرند، اما بعدها مشخص شد که هم در کودکان سالم و هم در بزرگ سالان دارای نقص سیستم ایمنی باعث بروز بیماری می‌گردد و یکی از عوامل اصلی اسهال در بیماران مبتلا به ایدز می‌باشد (۲). در افراد دارای سیستم ایمنی سالم، عفونت خود محدود شونده وغالباً بدون علامت می‌باشد، اما در افراد سالخورده، نوزادان، بیماران مبتلا به ایدز، کودکان دچار سوء تغذیه یا پیوند اعضاء و نیز شیمی درمانی نشانه‌های آلودگی بروز می‌یابد و نتیجهٔ نهایی بیماری حاد، مرگ سلولهای اپیتلیال روده و آتروفی پرزهای روده‌ای بوده که منجر به

* کارشناسی ارشد انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** دانشیار گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** استاد گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (fallah@umsha.ac.ir)

سوء جذب، تغییر نفوذپذیری روده وایجاد اسهال آبکی می‌شود (۳). باتوجه به اینکه کریپتوسپوریدیوم یک تک‌یاختهٔ داخل سلولی بوده که باعث آلودگی اپیتلیوم مجرای گوارشی می‌گردد و چون آلودگی به آن غالباً برای هفته‌ها و ماه‌ها پایدار می‌ماند، لذا می‌توان آلودگی به آن را دلیل سندروم التهاب پس از آلودگی Post infection inflammatory syndrome (PIIS) دانست (۴).

درمان بیماری ناشی از این تک یاخته دشوار است و داروهای ضدانگل موجود بر روی آن تاثیر چندانی ندارند. ازجمله داروهایی که جهت درمان بکار رفته است می‌توان پاراموماسین، آزیترومایسین، روکسی ترومایسین، نیتازوکسانید و... را نام برد که داروی نیتازوکسانید مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا قرار گرفته است. این دارو تنها در بیماران دارای سیستم ایمنی کامل مؤثر واقع میشودو در افراد دارای نقص سیستم ایمنی اثربخشی دارو به شدت کاهش می‌یابد بطوریکه در دوز mg ۱۵۰۰-۲۰۰۰ به مدت ۱۲ هفته فقط تاحدی مؤثر است. متاسفانه دوز بسیار بالا و زمان مصرف طولانی باعث تشدید عوارض جانبی دارو می‌گردد (۵). وجود اسهال آبکی شدید در بیماران باعث دفع سریع دارو و کاهش اثربخشی آن می شود. به نظر می‌رسد طراحی دارو به شکلی که زمان ماندگاری آن در روده و یا اتصال دارو به مخاط روده و رها شدن به فضای پارازیتوفورس افزایش یابد کمک شایانی به افراد دارای ریسک بالا می‌نماید(۶). هدف مطالعه حاضر این بود که با تبدیل داروی نیتازوکسانید به فرم کپسوله شده در نانو ذرات SLN و بررسی میزان اثربخشی آن در مقایسه با داروی معمولی با استفاده از مدل موشی، روشی در جهت درمان مؤثرتر بیماری معرفی گردد.

روش کار:

جمع‌آوری کریپتوسپوریدیوم از نمونه‌های آلوده: اواوسیست‌های کریپتوسپوریدیوم از مدفوع گوساله‌ها جداسازی و تخلیص شد. برای این کار، نمونه‌های مدفوع از گوساله‌های جوان ۱ الی ۲ ماهه مبتلا به اسهال از گاوداری های اطراف سنندج و نیز موارد ارجاع شده به کلینیکهای دامپزشکی این شهر با آزمایش رکتال اخذ شد و هم حجم آن بیکرومات پتاسیم ۲/۵ درصد اضافه و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد سنندج منتقل گردید. پس از تهیه گسترش و فیکساسیون با الکل، به روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی و از نظر وجود اواوسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در بزرگنمائی ۴۰ میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۴۳ نمونه جمع آوری شده، ۴ نمونه دارای آلودگی بیش از ۲۰ اواوسیست در هر میدان میکروسکوپی بودند و از میان آنها نمونه‌ای که بیشترین تعداد اواوسیست را در میدان میکروسکوپی داشت جهت جداسازی و تخلیص انتخاب گردید. نمونه مدفوع انتخاب شده با ۳ برابر حجم PBS (pH=7.2) مخلوط و از الک‌های مختلف عبور داده شد و محلول جمع آوری شده به لوله آزمایش منتقل و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سه بار سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر سوپرناتانت حذف و در یک لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری رسوب حاصله با ۴۰ میلی‌لیتر محلول ساکارز ۵۵ درصد خنک به خوبی مخلوط گردید و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر بسیار خنک به آرامی روی آن ریخته شد، بطوریکه دو قسمت مجزا تشکیل گردید. لوله با g ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سه قسمت مجزا شامل لایه آب مقطر در بالا، اواوسیست‌های شناور شده در لایه میانی و یک لایه رسوب در ته لوله حاصل گردید. لایه میانی به آرامی خارج و در PBS (pH=7.2) حل شد و با ۱۹۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به منظور حذف کامل محلول ساکارز، این کار سه مرتبه تکرار شد. در مرحله آخر رسوب حاصله در ۱۰ سی‌سی PBS حل شده و تعداد اواوسیست‌ها با لام هموسیتومتر شمارش گردید (۷). جهت بررسی نهائی، از اواوسیست‌های جدا شده گسترش تهیه و به روش ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی و بررسی گردید.

تهیه و آلوده سازی نوزاد های رت : نوزادهای یک روزه رت نژاد ویستار همراه با مادرهای شیرده به ۶ گروه دوازده تائی تقسیم شده و در شرایط استاندارد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۵ درصد و سیکل‌های ۱۲ ساعته نور و تاریکی در قفس های پلی کربنات شفاف استریل شده با الکل ۷۰ درجه، جیره غذائی استاندارد و بستر خاک اره استریل نگهداری شدند. به منظور تطابق یافتن با شرایط جدید، حیوانات مورد مطالعه به مدت ۲۴ ساعت بدون هیچ اقدام مداخله‌ای در مکان جدید نگهداری شدند. در روز سوم تولد نوزادها، برای آلوده نمودن گروههای ۱ تا ۵ ، نوزادها به مدت ۱ ساعت از مادران جدا شدند تا محتویات معده آنها تخلیه و آماده گاواژ دهانی شود. سپس توسط سمپلر و با دقت فراوان با ۵۰ میکرولیتر از محلول

حاوی اواوسیست تلقیح دهانی شدند. این کار برای گروه‌های ۱ تا ۵ بطور همزمان انجام شد. همزمان نوزادان گروه ۶ نیز توسط ۵۰ میکرولیتر PBS و به همان روش گاواژ شدند.

بررسی میزان آلودگی: جهت بررسی میزان آلودگی، از روش شمارش تعداد اواوسیست در مجرای روده استفاده شد. به این منظور، موش‌ها پس از بیهوشی توسط اتر اتانازی شده و روده آنها بطور کامل از ابتدای دئودنوم تا انتهای رکتوم خارج و در ۵ سی‌سی بافر فسفات قرار داده شد و توسط هموژنایزر اولترا توراکس هموژنیزه گردید. مراحل هموژنیزاسیون ۳ مرتبه و هربار به مدت ۱۰ ثانیه تکرار شد و حجم کلی هموژنیزات بدست آمده یادداشت شد (۸). محلول بدست آمده با ۵ سی‌سی PBS (pH=7.2) مخلوط و به ترتیب از الک‌های شماره ۴۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ عبور داده شد و محلول جمع آوری شده از الک آخر به لوله آزمایش منتقل و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. این کار سه مرتبه تکرار گردید. برای زدودن چربی، رسوب به لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری منتقل گردید. در این مرحله ۱۰ میلی لیتر از رسوب با یک حجم اتر بعلاوه سه حجم بیکربنات سدیم ۱ درصد به خوبی مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه تحت ۳۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. لایه چربی موجود در قسمت بالای ظرف دور ریخته شد(۷).

کپسوله کردن داروی نیتازوکسانید: پودر داروی نیتازوکسانید با گرید آنالیتیکال از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه و در SLN با روش high-pressure homogenization کپسوله شد. بدین ترتیب که لیپید جامد Palm oil یا S154 و لسیتین سویا یا S100 به عنوان ماده زمینه در یک ظرف سرامیکی بترتیب به نسبت ۷۰ و ۳۰ اضافه و ترکیب تا دمای 70-65 درجه سانتیگراد گرم شد. سپس با یک مگنت مخلوط گردید تا یک ترکیب شفاف مایل به زرد به نام ماتریکس لیپیدی ایجاد شود. در مرحله بعد محلول شامل۱ میلی لیتر اولئیل الکل ۰/۰۰۵ گرم تیموسال و ۴/۷۵ گرم سوربیتول و ۸۹/۲۵ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه در دمای یکسان به ۵ گرم از ماتریکس لیپیدی اضافه شد. امولسیون SLN با استفاده از هموژنایزر اولترا توراکس با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه برای ۳۰ دقیقه بدست آمد.

در مرحله بعد، ۱ میلی گرم از داروی نیتازوکسانید در اولئیل الکل حل شد و با امولسیون SLN توسط هموژنایزر اولتراتوراکس (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه) مخلوط گردید. به منظور تعیین بهترین نسبت از جهت بالاترین بازدهی کپسوله نمودن دارو، ۳ فرمولاسیون دارویی به شرح زیر تهیه شد:

فرمولاسیون یک: ۱میلی گرم دارو + ۵ میلی گرم SLN یا (SLNa)

فرمولاسیون دو: ۱میلی گرم دارو + ۱۰ میلی گرم SLN یا (SLNb)

فرمولاسیون سه: ۱میلی گرم دارو + ۲۰ میلی گرم SLN یا (SLNc)

مخلوط حاصل یک شب در دمای ۶۰-۵۰ درجه انکوبه شد و سپس در معرض هوا قرار گرفت تا متبلور و جامد شود.

اندازه‌گیری نیتازوکسانید موجود در SLN : غلظت دارو به روش طیف سنجی نوری و با تهیه غلظت‌های استاندارد از دارو گزارش شد (۹).

تعیین درصد بازدهی داروی کپسوله شده : برای اندازه‌گیری درصد بازدهی، SLN لود شده با دارو در متانول دیسپرس و با دور 20000g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان داروی موجود در محلول رویی که با SLN لود نشده، به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد و توسط فرمول زیر درصد بازدهی محاسبه گردید:

$$EE\% = \frac{W\ initial\ drug - W\ freedrug}{W\ initial\ drug} \times 100\%$$

اندازه گیری سایز و بار الکتریکی ذرات: میانگین سایز ذره‌ای و توزیع سایز نانو ذرات توسط High performance particle sizer (HPP5001) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پتانسیل زتای نانو ذرات از Zeta potential analyzer (zeta sizer) استفاده شد.

بررسی مرفولوژی ذرات: برای مشاهده مورفولوژی ذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. ساختمان فضایی فرمولاسیون با اشعه مادون قرمز Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) بررسی گردید. ساختمان فضایی نانوذرات و دارو توسط اشعه مادون قرمز تعیین شد.

آزادسازی دارو ازSLN بصورت In Vitro : ۵۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی SLN و دارو به۱ میلی لیتر پلاسمای انسانی اضافه شد. سپس نمونه با دور ۴۰۰۰۰ g به مدت یک ساعت سانتریفیوژ گردید که باعث جدا شدن SLN ها شد. پروتئین‌های پلاسمائی موجود در محلول رویی با نسبت

۱ به ۲ با متانول مخلوط و در دور ۱۵۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید که باعث ته‌نشین شدن پروتئین‌ها شد. میزان داروی آزاد موجود در محلول رویی که با SLN پروتئین لود نیست به روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید (۹).

مراحل اجرای مداخله : پس از اثبات آلودگی در رت ها و تعیین میزان آن در گروه‌های ۱ تا ۵ ، مداخله به شرح زیر انجام شد:

گروه۱) موش‌های آلوده شده تحت اثر داروی نیتازوکسانید آزاد: نوزادهای آلوده این گروه با دوز ۲mg/kg به مدت ۶ روز بصورت تک دوز روزانه از طریق گاواژ دهانی تحت اثر داروی آزاد قرار گرفتند.

گروه۲) موشهای آلوده شده تحت اثر نیتازوکسانید کپسوله شده در SLN: این موشها نیز همانند گروه اول و با همان دوز به مدت ۶ روز بصورت تک دوز روزانه تحت تاثیر قرار گرفتند.

گروه۳) موشهای آلوده شده تحت اثر حامل کلوئیدی (SLN) فاقد نیتازوکسانید: موش‌های آلوده این گروه تحت اثر حامل کلوئیدی فاقد دارو و با همان نسبت بکار برده شده در تهیه داروی کپسوله شده به مدت ۶ روز بصورت تک دوز روزانه تحت تاثیر قرار گرفتند.

گروه۴) موشهای آلوده شده تحت اثر روغن زیتون: با توجه به اینکه نیتازوکسانید در روغن زیتون حل شده است، تاثیر این فاکتور بر روی تعداد اواوسیست‌ها بایستی بطور مجزا مورد بررسی قرار می‌گرفت. به این منظور موش‌های این گروه با همان نسبت بکار برده شده در ترکیبات مورد مطالعه، به مدت ۶ روز و بصورت تک دوز روزانه تحت تاثیر قرار گرفتند.

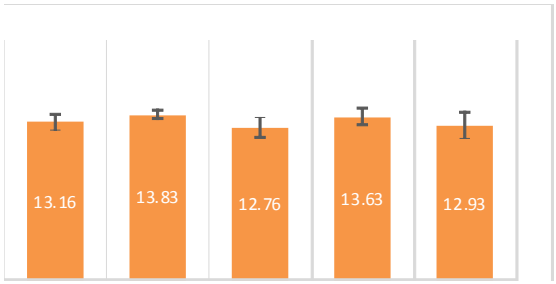
گروه۵) موشهای آلوده شده گروه شاهد: این موش‌ها دقیقاً مشابه گروههای فوق آلوده شدند و جهت بررسی تاثیر سیستم ایمنی نوزاد موش بر شدت آلودگی و مقدار اواوسیست انگل و نیز بدست آمدن معیاری جهت تاثیر ترکیبات مورد مطالعه به موازات مراحل مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. موشهای این گروه به مدت ۶ روز و بصورت تک دوز روزانه تحت تاثیر بافر فسفات قرار گرفتند.

گروه۶) موشهای سالم فاقد آلودگی تحت اثر بافر فسفات: موشهای این گروه کاملاً سالم و بدون ایجاد آلودگی و به منظور بررسی عدم تاثیر شرایط و استرس های محیطی، دستکاری و گاواژ بر وضعیت موشهای مورد مطالعه و نیز اثبات عدم تاثیر بافر فسفات بر وضعیت سلامت موش‌ها، مورد مطالعه قرار گرفتند. این گروه روزانه ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات بصورت تک دوز دریافت می‌نمود.

مراحل بررسی نتایج : جهت بررسی میزان آلودگی در رتها، در روز ششم پس از تلقیح انگل، از هرگروه ۳ نوزاد و همچنین جهت ارزیابی اثر مداخلات بعمل آمده، روز سوم و ششم پس از شروع مداخلات، از هر گروه ۳ و ۶ نوزاد موش به ترتیب بصورت تصادفی انتخاب و تعداد اواوسیست‌های مجرای روده طبق روش ذکر شده مورد شمارش قرار گرفت و نتایج ثبت گردید.

نتایج:

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، شش روز پس از آلوده سازی موش‌ها تعداد انگل به سرعت افزایش یافته و در گروه سالم هیچ انگلی یافت نشد. مقایسه میانگین تعداد اواوسیست‌ها بین گروههای ۱ تا ۵ به روش آنالیز واریانس یک طرفه، تفاوت معنی داری را نشان نداد (P=0.425) که بیانگر آلودگی گروههای ۱ تا ۵ در یک سطح نسبتاً یکسان است.



شکل ۱ : میانگین تعداد اواوسیست‌های شمارش شده در رتهای مورد آزمایش در روز ششم پس از آلوده‌سازی

طبق شکل ۲، در روز سوم پس از مداخله، میانگین تعداد اواوسیست‌ها در گروه‌های یک و دو به طور معنی داری نسبت به گروه‌های آلوده و بدون تیمار کاهش پیدا کرده است (P<0.001). در گروه یک که داروی آزاد دریافت کردند نسبت به گروه دو که با نانوداروی نیتازوکسانید تیمار شده بودند کاهش نسبی تعداد انگل مشاهده شد اما نتایج آزمون t-test نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در تعداد انگل نبود (P= 0.182). در گروه های سه، چهار و پنج که به ترتیب حامل کلوییدی فاقد دارو، روغن زیتون و بافر فسفات دریافت کرده بودند نیز نسبت به تعداد اولیه انگل، میزان این انگل در موش‌ها به میزان قابل توجهی افزایش یافته بود.

شکل ۲ : میانگین تعداد اواوسیست‌های شمارش شده در رتهای مورد آزمایش در روز سوم پس از مداخله

در روز ششم پس از درمان، به طور قابل توجهی تعداد انگل در گروه‌های درمان کمتر از گروه‌های سه، چهار و پنج بود که ترکیب حاوی نیتازوکسانید دریافت نکرده بودند و این تفاوت معنی‌دار بود ($P< 0.001$) در مرحله آخر یعنی روز ۶ بعد از درمان، تعداد اواوسیست‌ها در گروههای ۳و۴و۵ نسبت به روز سوم بعد از درمان، کاهش نسبی پیدا کرده بود. در گروه‌های یک و دو که به ترتیب داروی آزاد و نانو داروی حامل نیتازوکسانید دریافت کرده بودند نتایج آزمون t-test نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در تعداد انگل بود ($P< 0.001$) (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین تعداد اواوسیست‌های شمارش شده در رتهای مورد آزمایش در روز ششم پس از مداخله

گروه های مورد مطالعه	میانگین ($\times 10^5$)
گروه ۱ (تیمار با داروی آزاد)	۰/۳۸
گروه۲ (تیمار با داروی کپسوله شده)	۰/۰۴۶
گروه ۳ (حامل کلوئیدی فاقد دارو)	۲۳/۶
گروه ۴ (تحت اثر روغن زیتون)	۲۴/۲
گروه ۵ (دریافت کننده بافر فسفات)	۲۱/۱
گروه ۶ (سالم بدون مداخله)	۰/۰

بحث:

مطالعه حاضر نشان می دهد که اگر دارو به شکل نانو ذرات مورد استفاده قرار گیرد می تواند تاثیر بیشتری بر روی انگل داشته باشد. از آنجایی که درمان بیماری ناشی از این انگل بسیار دشوار است و اغلب داروهای ضد انگل بر روی آن بی اثر هستند، شناخت درمان‌های نوین و اثرات آن بر روی روند بیماری‌زایی این انگل از مهمترین حیطه‌های تحقیقاتی است. با توجه به نکات فوق این مطالعه با هدف تعیین تولید نانوداروی نیتازوکسانید و بررسی اثر درمان ضد کریپتوسپوریدیائی آن در مقایسه با داروی آزاد در نوزاد موش انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان از تاثیر بهتر نانوداروی نیتازوکسانید نسبت به داروی آزاد در کنترل عفونت داشت. مطابق یافته ها در روز سوم پس از مداخله، میانگین تعداد اواوسیست‌ها در گروه‌های دریافت کننده داروی آزاد و دریافت کننده نیتازوکسانید کپسوله شده به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های آلوده و بدون تیمار کاهش پیدا کرده بود. همچنین شاهد کاهش نسبی تعداد انگل در گروه دریافت کننده داروی کپسوله شده نسبت به داروی آزاد بودیم اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. در روز ششم پس از مداخله، نتایج تفاوت بیشتری را نسبت به گروه‌های بدون تیمار نشان داد و حتی تعداد انگل شمارش شده در گروه دو بطور معنی داری کمتر از گروه یک بود که داروی آزاد دریافت کرده بود. تفاوت بین دو گروه دریافت کننده داروی آزاد (گروه۱) و داروی کپسوله شده (گروه۲) در روز سوم معنی دار نبود، اما در روز ششم معنی دار بود که نشان دهنده اهمیت طول درمان می‌باشد. بنظر می رسد با گذشت زمان نانوداروی کپسوله شده بطور تدریجی آزاد شده و مدت تماس دارو با انگل افزایش می یابد و در نتیجه منجر به تاثیر بیشتر می گردد. در بررسی تعداد انگل در گروههائی که نیتازوکسانید دریافت نکرده بودند (گروههای۳،۴،۵) شاهد افزایش تعداد انگل با گذشت زمان بودیم؛ اما این افزایش تا روز سوم ادامه داشته و در روز ششم تعداد انگل در این سه گروه تا حدی کاهش یافته بود. با توجه به مطالعات انجام شده، احتمالا فعال شدن سیستم ایمنی نوزادان موش با گذشت زمان منجر به این کاهش نسبی شده است. این مسئله نشان دهنده توانائی نسبی سیستم ایمنی در محدود نمودن تکثیر انگل است. اما مطالعات نشان داده است که سیستم ایمنی به تنهائی توانائی حذف کامل انگل را ندارد (۱۰). در مطالعه حاضر حتی تحت تاثیر داروی آزاد و کپسوله شده، اگرچه تعداد انگل به میزان زیادی کاهش یافت اما به صفر نرسید و این ممکن است به دلیل مقاومت داروئی برخی از انگل‌ها، نیاز به افزایش طول دوره درمان و یا دوز مصرفی باشد. می‌توان گفت که علت تاثیر بهتر نانو داروی نیتازوکسانید به دلیل محتوای لیپیدی نانوداروی نیتازوکسانید باشد. چرا که نانو ذرات لیپیدی جامد به

دلیل ساختار لیپیدی و اندازه کوچک خود به دیواره روده متصل شده و مشکل دفع سریع داروی آزاد بدین گونه حل و با افزایش میزان تحویل دارو تاثیر آن بیشتر می شود.

شکل نانو داروی نیتازوکسانید علاوه بر کریپتوسپوریدیوزیس (۱۲)، در درمان بیماریهای دیگر از جمله لیشمانیوز احشایی و همچنین کنسر تخمدان نیز به کار رفته و نتایج نسبتا امید بخشی داشته است (۱۳،۱۴).

نتیجه نهایی:

با توجه به نتیجه مطالعه حاضر بنظر می رسد فرمولاسیون دارو به شکل نانو می تواند تاثیر آن را در درمان بیماریها افزایش دهد. مطالعه حاضر حاکی از تاثیر بهتر شکل نانونیتازوکسانید در مقایسه با شکل آزاد آن در درمان کریپتوسپوریدیوزیس می باشد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، استفاده از نانو داروی نیتازوکسانید برای درمان کریپتوسپوریدیوزیس پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری:

از معاونت محترم تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی همدان که بخشی از هزینه انجام این تحقیق را تامین نمودند صمیمانه تشکر می شود. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تضاد نمی باشد.

References

1. Rossignol JF. Cryptosporidium and Giardia: treatment options and prospects for new drugs. Exp Parasitol 2010;124(1):45-53.
2. Gargala G. Drug treatment and novel drug target against Cryptosporidium. Parasite 2008;15(3): 275-81.
3. Colford JM Jr, Tager IB, Hirozawa AM, Lemp GF, Aragon T, Petersen C. Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival. Am J Epidemiol 1996; 144(9): 807-816.
4. Rossignol JF, Kabil SM, el-Gohary Y, Younis AM. Effect of nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by Cryptosporidium species. Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4(3):320-4.
5. Rossignol JF Ayoub A, Ayers M.S. Treatment of diarrhea caused by Cryptosporidium parvum: a prospective randomized, double-blind, placebocontrolled study of nitazoxanide. J Infec Dis 2001; 184(1): 103–6.
6. Kayser O. A new approach for targeting to Cryptosporidium parvum using mucoadhesive nanosuspensions: research and applications. Int J Pharm 2001;214(1-2):83-5.
7. Shayan P, Asghari Z, Ebrahipzadeh E, Omidian Z, Zargami F. Presenting an Appropriate Method for Isolation of Bacteria Free Cryptosporidium parvum Oocysts. J Vet Microbiol 2012; 8(25):75-90. (Persian)
8. Blagburn BL, Sundermann CA, Lindsay DS, Hall JE, Tidwell RR. Inhibition of Cryptosporidium parvum in neonatal Hsd:(ICR)BR Swiss mice by polyether ionophores and aromatic amidines. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(7): 1520-3.
9. Malesuik MD, Paim CS, Schapoval EES, Steppe M. Development of a simple, rapid and validated spectrophotometric method for nitazoxanide in pharmaceutical formulations and comparison with HPLC. Química Nova 2010;33: 739-42.
10. Klokouzas A, Shahi S, Hladky SB, Barrand MA, van Veen HW. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. Int J Antimicrobial Agents 2003; 22(3): 301-17
12. Blagburn BL, Drain KL, Land TM, Kinard RG, Moore PH, Lindsay DS, et al. Comparative efficacy evaluation of dicationic carbazole compounds, nitazoxanide, and paromomycin against Cryptosporidium parvum infections in a neonatal mouse model. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(11):2877-82.
13. Pandya, S, Dasari L, Mitra K, Singh R, Misra A:Nitazoxanide-Loaded PLGA Nanoparticles for Therapeutic Intervention in Visceral Leishmaniasis. 50th American Association Pharmaceutical Scientists Conference, San Francisco, June 8-10 October 2015 (Abstracts).
14. Luo H, Jiang B, Li B, Li Z, Jiang BH, Chen YC. Kaempferol nanoparticles achieve strong and selective inhibition of ovarian cancer cell viability. Int J Nanomedicine. 2012; 7:3951-9. doi: 10.2147/IJN.S33670. Epub 2012 Jul 24.

Original Article

Comparison of Therapeutic Effect of Anti-Cryptosporidium Nano-Nitazoxanide (NTZ) with Free form of this Drug in Neonatal Rat

F. Sedighi, M.Sc.[*] ; R. Abbasali Pourkabir, Ph.D.[**] ; A.H. Maghsood, Ph.D.[***]
M. Fallah, Ph.D.[****]

Received: 23.12.2015 Accepted: 10.5.2016

Abstract

Introduction & Objective: Cryptosporidiosis caused by Cryptosporidium, which is a protozoan parasite, has a worldwide distribution. The infection is through fecal-oral route, direct or indirect contact, food or water. The treatment of cryptosporidiosis is difficult and the anti-parasitic agents are not effective. The purpose of this study was encapsulation of nitazoxanide in solid lipid nano-particles (SLN) and investigation of its anti-Cryptosporidium effect and its comparison with free drug in the neonatal rat.

Materials & Methods: Nitazoxanide was encapsulated by HPH method with 2 mg/Kg concentration in SLN nanoparticles. The oocysts were collected from calves and purified by sucrose floatation. A total of 72 Wistar neonatal rats were categorized in 6 groups of 12 rats including four infected groups treated by free drug, encapsulated nano drug, colloidal carriers without drug (SLN) and olive oil; an infected control group and a healthy control group that received PBS. 5×10^5 of oocyts inoculated orally into the sample groups. Finally, intestine of each rat was homogenized in PBS by rotor and the homogenized material was passed through a sieve. Then, floated oocysts in sucrose solution were counted by hemocytometer.

Results: Treatment by nitazoxanide significantly decreased the number of parasites in the treatment groups. This decrease at day 6 was more than day 3. Nano nitazoxanide had more effects on parasites than free drug. This difference at day 3 of treatment was not significant ($p= 0.182$) but at day 6 was statistically significant ($P< 0.001$).

Conclusion: Using nano-nitazoxanide could be a more effective way in the treatment of Cryptosporidium infections.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2016; 23 (2):134-140)

Keywords: Cryptosporidium / Nanomedicine / Nitazoxanide / Solid Lipid Nanoparticle

---

* M.Sc. in Parasitology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
** Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
*** Associate Professor, Department of Parasitology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
**** Professor, Department of Parasitology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (fallah@umsha.ac.ir)