

EFEKT TERAPII PRZECIWRÓBACZEJ WSPOMAGANEJ GLUKANEM W DOŚWIADCZALNEJ TOKSOKAROZIE

MIECZYŚLAW DYMON I BARBARA PAPIR

Zakład Parazytologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum UJ, ul. Czysła 18, 31-121 Kraków

ABSTRACT. *Effect of anthelmintic therapy supplemented with glucan in experimental toxocarosis.* The studies demonstrated high larvicidal efficiency of the combined liposomal anthelmintic therapy supplemented with liposomal (β -glucan) which acted as immunomodulator on the immune system of the infected animals. Therapeutic effect was very high in the treatment of hepatopneumonic toxocarosis as well as in cerebromuscular infection, reaching 94.3 and 89.3 % in the liver, 89.8 and 92.4 % in the lungs, 88.7 and 91.5 % in the muscles, and 91.5 and 90.5 % in the brain, respectively. It should be emphasized that although both anthelmintic combinations had high larvicidal efficacy, the combination I(DEC+FUBZ+L) was more efficacious in the muscles, while I(DEC+ABZ+L) was more efficient in the brain, independently of whether the treatment was implemented on 7th day after infection or on 47th infection day. It did not exceed the dose of one of these drugs used in monotherapy, whose larvicidal efficacy was always 2 or 3 times lower. Animals well tolerated the drug doses throughout the whole experimental period.

Key words: combined therapy, immunomodulator glucan, liposomes, toxocarosis.

WSTĘP

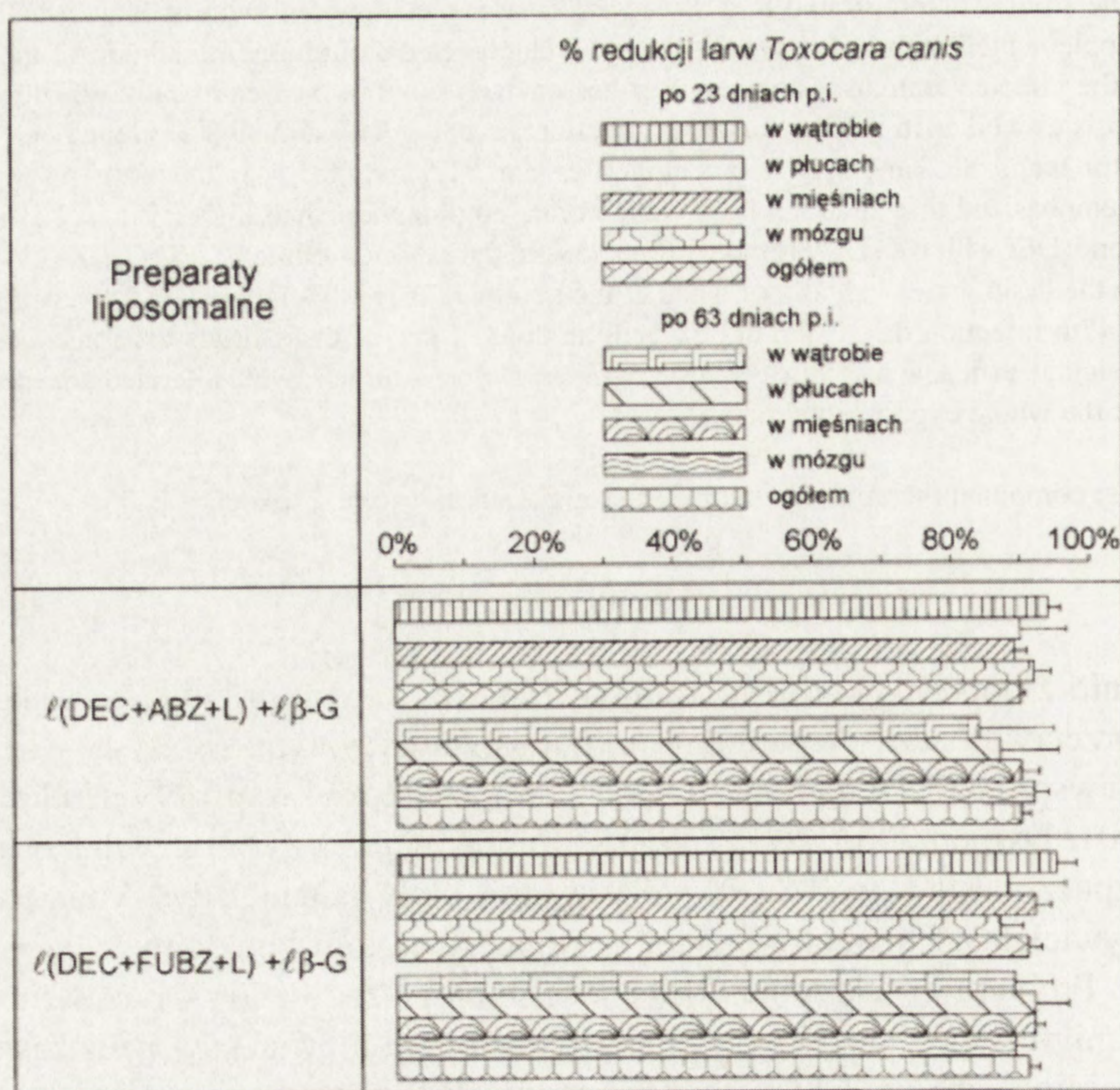
Ostatnio z dobrym skutkiem (zabijanie larw pasożyta) próbuje się wspomagać terapię przeciwróbaczą preparatami immunostymulacyjnymi (Šoltys i wsp. 1996; Velebný i wsp. 1997; Dymon i wsp. 1998; Dvoražňáková i wsp. 1999; Hřčková i Velebný 2001; Dymon 2002, 2003). Większość leków przeciwróbaczych stosunkowo słabo rozpuszcza się w wodzie, co niekorzystnie wpływa na ich dystrybucję w organizmie żywiciela a zatem utrudnia ich dostępność biologiczną do migrujących larw pasożyta. Problem zwiększenia dostępności biologicznej leków przeciwróbaczych dla larw migrujących może być w znacznym stopniu rozwiązany przez zastosowanie postaci liposomalnej leków. Postęp badań w tym zakresie pozwala mieć nadzieję na znacznie efektywniejszą terapię wielu chorób, w tym również inwazji wywołanych przez pasożyty (Delgado i wsp. 1990, Senior i wsp. 1991, Velebný i wsp. 2000, Banerjee 2001, Ishida i wsp. 2002).

Biorąc pod uwagę wyniki naszych wcześniejszych doświadczeń (Dymon 2002, 2003) oraz biologiczne zdolności larw *T. canis* do unikania mechanizmów obron-

nych żywiciela, postanowiliśmy sprawdzić efekt kombinowanej terapii czterech leków przeciwwrobaczych w postaci liposomalnej wspomaganych dodatkowo liposomalnym β -glukanem.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 60 myszach wsobych szczepu Swiss, 6-tygodniowych samcach o wadze 20-22 g. Zwierzęta zarażano dożołądkowo zawiesiną inwazyjnych larw *Toxocara canis*, dawką 1000 jaj/0,1 ml 0,85% NaCl na mysz. Zwierzęta z grupy I i II były leczone dietylokarbamazyną (DEC), albendazolem (ABZ), lewamizolem (L) i flubendazolem (FUBZ), które zamykano w preliposomach (Sigma, nr kat. L 3906), w kombinacjach: DEC+ABZ+L dla grupy I i DEC+FUBZ+L dla grupy II w stosunku w/w 2:2:1 odpowiednio. Leki zamknięte



$\ell(\text{DEC+ABZ+L}) + \ell\beta\text{-G}$ - liposomalna postać kombinowanych antyhelmintyków:
 DEC - dietylokarbamazyny, ABZ - albendazolu (lub FUBZ - flubendazolu),
 L - lewamizolu. $\ell\beta\text{-G}$ - liposomalna postać β -glukanu.

Rys. 1 Efekt terapeutyczny liposomalnych postaci kombinowanych leków przeciwwrobaczych wspomaganym immunomodulacyjnym działaniem liposomalnego β -glukanu w leczeniu mysiej toksokarozy w fazie wątrobowo-płucnej po 23 dniach i mięśniowo-mózgowej po 63 dniach po infekcji (p.i.)

w liposomach podawano podskórną (sc) w dawce 25 mg/kg mc w objętości 50 μ l co 12 godzin przez 5 kolejnych dni, rozpoczynając od 7 dnia po infekcji (p.i.) w grupie I i od 47 dnia p.i. w grupie II. Ponadto zwierzęta z grupy I i II otrzymały dwukrotnie domięśniowo (i.m.) po 5 mg/kg mc liposomalny β -glukan. Zwierzęta z grupy I były leczone kombinacją preparatów przeciwróbaczych i immunostymulowane β -glukanem I(DEC+ABZ+L)+I β -G. W grupie II zwierzęta leczono kombinacją I(DEC+FUBZ+L)+I β -G. Każda z grup (I i II) miała własną kontrolę (III-Ko/I, III Ko/II), gdzie podawano dożołądkowo 0,1 ml 0,85% NaCl na mysz (placebo). W 23 i 63 dniu po zakończeniu doświadczenia zwierzęta usypiano, pobierano do dalszych badań narządy (wątrobę, płuca, mięśnie, mózg). Po mechanicznym rozdrobieniu narządów, tkanki poddawano trawieniu w roztworze 0,5% pepsyny z dodatkiem 0,7% kwasu solnego, przy pH 1,5 i w temp. 37°C. Liczbę wytrawionych larw obliczano w komorze McMastera pod mikroskopem. Miarą efektu terapeutycznego (ET) stosowanych leków był procent redukcji liczby larw u zwierząt leczonych w stosunku do liczby larw u zwierząt nieleczonych. Wartość ET dla poszczególnych grup doświadczalnych obliczano posługując się wzorem: $ET(\%) = [(N-n)/N] \times 100$ (szczegółowe objaśnienie pod Tabelą 1).

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania wykazały wysoką skuteczność liposomalnej kombinowanej terapii przeciwróbaczej wspomaganą liposomalnym β -glukanem, działającym immunomodulacyjnie na układ odpornościowy zarażonych zwierząt. Efekt terapeutyczny był bardzo wysoki zarówno w leczeniu toksokarozy wątrobowo-płucnej (w wątrobie 94,3 i 89,3%; w płucach 89,9 i 92,4%), jak również mięśniowo-mózgowej (w mięśniach 88,7 i 91,5%; w mózgu 91,5 i 90,5%). Obie kombinacje leków przeciwróbaczych były wysoce skuteczne, ale kombinacja I(DEC+FUBZ+L) była efektywniejsza w mięśniach, natomiast I(DEC+ABZ+L) w mózgu, niezależnie od tego czy leczenie rozpoczęto w 7 dniu p.i. czy też w 47 dniu p.i. Należy zaznaczyć, że połączona dawka DEC+ABZ+L lub DEC+FUBZ+L nie przekraczała dawki jednego z tych leków jakie stosuje się w terapii jednym lekiem. Efekt terapeutyczny zastosowanej kombinowanej terapii, wspomaganą liposomalnym glukanem jest dwu- lub trzykrotnie wyższy niż skuteczność terapeutyczna stosowanego w leczeniu pojedynczego leku (Rys. 1; Tabele 1,2).

Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze spostrzeżenia (Dymon 2002, 2003), że terapia przeciwróbacza przy równoczesnym zastosowaniu dwóch lub trzech leków jest bardziej efektywna od terapii jednym lekiem. Stosowanie kombinowanej liposomalnej postaci leków przeciwróbaczych zwiększa efekt ich działania. Efekt ten jeszcze bardziej wzmacnia się po podaniu zwierzętom liposomalnego immunomodulatora - β -glukanu. Wiadomo, że same liposomy działają jako adjuwanty na układ immunologiczny. Ponadto poprawiają w organizmie dystrybucję leku oraz

zwiększają jego dostępność biologiczną do larw migrujących *Toxocara*. Również zamknięte w liposomach leki o różnym punkcie uchwytu do struktur funkcjonalnych larwy (receptorów) umożliwia lekom kompleksowe destrukcyjne działanie na kilku poziomach, co w konsekwencji wyraża się zwiększoną redukcją larw w narządach, a zatem lepszym efektem terapeutycznym (ET) kombinowanych leków przeciwwrobaczych.

Tabela 1. Efekt terapeutyczny liposomalnej postaci kombinowanych leków przeciwwrobaczych i liposomalnego β -glukanu po pięciu dniach leczenia toksokarozy wątrobowo-płucnej rozpoczętej od 7 dnia p.i.

Lokalizacja larw	Grupa myszy	Średnia liczba larw <i>Toxocara canis</i> po leczeniu 1(DEC+ABZ+L)+1 β -G							
		23 dni p.i.				63 dni p.i.			
		mean	\pm SD	%ET	\pm SD	mean	\pm SD	%ET	\pm SD
Wątroba	I (n=10)	1,6	0,5	94,3	1,7	0,9	0,7	83,9	12,8
Płuca	I (n=10)	0,6	0,6	89,8	10,2	0,7	0,6	86,8	10,6
Mięśnie	I (n=10)	17,8	3,1	88,7	1,9	12,5	3,4	89,6	2,7
Mózg	I (n=10)	4,8	1,4	91,5	2,4	8,7	2,1	91,6	2,0
Razem		24,8	1,8	90,0	0,7	22,8	3,4	90,3	1,5
Wątroba	IIIKo/I (n=10)	28,3	2,7	–	–	5,6	1,2	–	–
Płuca	IIIKo/I (n=10)	5,9	1,2	–	–	5,3	1,7	–	–
Mięśnie	IIIKo/I (n=10)	157,3	7,5	–	–	120,6	7,9	–	–
Mózg	IIIKo/I (n=10)	56,6	4,7	–	–	103,3	10,3	–	–
Razem		248,0	7,6	–	–	234,8	16,0	–	–

1(DEC+ABZ+L)+1 β -G – liposomalna postać kombinowanych leków przeciwwrobaczych: DEC – dietylokarbamazyna; ABZ – albendazol; L – lewamizol oraz 1 β -G – liposomalny β -glukan; ET(%) – efekt terapeutyczny = $[(N-n)/N] \times 100$, gdzie N – średnia arytmetyczna z liczby larw odzyskanych w grupie nieleczonej; n – średnia arytmetyczna z liczby larw odzyskanych w grupie leczonej; p.i. – po infekcji

W patologicznym mechanizmie inwazji robaczych, w tym także w toksokarozie, obserwuje się immunosupresyjne działanie pasożyta na żywiciela. Niewyjaśniony pozostaje problem immunodepresyjnego działania samych leków benzimidazolowych w terapii przeciwwrobaczej. Ta ostatnia kwestia nie znajduje poparcia w wynikach naszych badań jak również innych autorów. Wyniki badań Dvorožňákovéj (1998) zaprzeczają tej tezie jakoby benzimidazole (albendazol i fenbendazol) oprócz efektu prowadzącego do zabijania robaków miały również wzmacniać immunosupresyjne działanie pasożyta. Autorka wykazała bowiem, że albendazol i fenbendazol ujawniają swoje właściwości immunokompetencyjne (naprawcze) podobnie jak lewamizol, co w przypadku inwazji należy uznać jako zjawisko pozytywne.

Wyniki naszych badań wydają się bardzo interesujące z uwagi na wysoki procent redukcji larw *Toxocara*. Fakt ten można tłumaczyć wprowadzeniem do leczenia zwierząt w prezentowanych badaniach liposomalnej postaci trzech kombinowanych leków przeciwwrobaczych o różnym punkcie uchwytu.

Podsumowując wyniki naszych doświadczeń należy mieć nadzieję, że dalsze badania z zastosowaniem kombinowanej przeciwwrobaczej terapii ze stabilizowanymi

immunoliposomami mogą doprowadzić do całkowitej redukcji larw *Toxocara canis* z organizmu żywiciela.

Tabela 2. Efekt terapeutyczny liposomalnej postaci kombinowanych leków przeciwróbaczych i liposomalnego β -glukanu po pięciu dniach leczenia toksokarozy mięśniowo-mózgowej rozpoczętej od 47 dnia p.i

Lokalizacja larw	Grupa myszy	Średnia liczba larw <i>Toxocara canis</i> po leczeniu I(DEC+ABZ+L)+I β -G							
		23 dni p.i.				63 dni p.i.			
		mean	\pm SD	%ET	\pm SD	mean	\pm SD	%ET	\pm SD
Wątroba	I (n=10)	1,4	0,8	95,03	2,9	0,6	0,5	89,3	8,6
Płuca	I (n=10)	0,7	0,6	88,1	9,5	0,4	0,5	92,4	9,1
Mięśnie	I (n=10)	13,6	3,5	91,6	2,2	10,3	1,7	91,5	1,4
Mózg	I (n=10)	7,6	1,9	86,5	3,2	11,1	2,6	89,2	2,6
Razem		23,3	4,8	90,6	1,9	22,4	3,8	90,5	1,6
Wątroba	IIIKo/II (n=10)	28,3	2,7	–	–	5,6	1,2	–	–
Płuca	IIIKo/II (n=10)	5,9	1,2	–	–	5,3	1,7	–	–
Mięśnie	IIIKo/II (n=10)	157,3	7,5	–	–	120,6	7,9	–	–
Mózg	IIIKo/II (n=10)	56,6	4,7	–	–	103,3	10,3	–	–
Razem		248,0	7,6	–	–	234,8	16,0	–	–

I(DEC+FUBZ+L)+I(-G – liposomalna postać kombinowanych leków przeciwróbaczych: DEC – dietylokarbamazyna; FUBZ – flubendazol; L – lewamizol; I β -G – liposoma Tabelny β -glukan; pozostałe objaśnienia jak w Tabeli 1

LITERATURA

- Banerjee R. 2001. Liposomes: Applications in Medicine. *Journal of Biomaterials Applications* 16: 3-21.
- Delgado C., Patel J.N., Francis G.E., Fisher D. 1990. Coupling of poly(ethylene glycol) to albumin under very mild conditions by activations with tresyl chloride: characterization of the conjugate by partitioning in aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 12: 119-128.
- Dvorožňáková E. 1998. Modulácia immunitnej odpovede paratenického hostiteľa po terapii experimentálnej toxokarózy. Autoreferát dizertačnej práce, Košice 1998.
- Dvorožňáková E., Borošková Z., Dubinský P., Tomašovičova O., Hřibalová V., Machnicka B. 1999. Immunomodulative effect of muramyldipeptide in mice with larval toxocarosis. *Parasitology Research* 85: 1034-1040.
- Dymon M., Borysiewicz J., Zworowska K., Papier B. 1998. Immunomodulators amplifying therapeutic effect of anthelmintic drugs in experimental trichinellosis. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 564.
- Dymon M. 2002. Therapeutic effect of glucan assisted individual and combined benzimidazoles in larval toxocarosis in mice. 5. *Slovenské a české parazitologické dni 28-31 mája 2002*, Parazitologický ústav SAV w Košiciach, SR.
- Dymon M. 2003. Efekt kombinowanej antyhelmintrycznej terapii wspomaganiej (β -glukanem) w doświadczalnej toksokarozie. Sympozjum Parazytozy – problemy kliniczne. Białystok, 6 czerwca: 65.
- Hrčková G., Velebný S. 2001. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome – incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. *Journal Helminthology* 75: 141-146.

- Ishida T., Harashima H., Kiwada H. 2002. Liposome clearance. *Bioscience Reports* 22: 197-224.
- Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C., Gregoriadis G. 1991. Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1062: 77-82.
- Šoltys J., Borošková Z., Dubinský P., Tomašovičová O., Auer H., Aspöck H. 1996. Effect of glucan immunomodulator on the immune response and larval burdens in mice with experimental toxocarosis. *Applied Parasitology* 37: 161-167.
- Velebný S., Tomašovičová O., Hřčková G., Dubinský P. 1997. *Toxocara canis* in mice: are liposomes and immunomodulator able to enhance the larvicidal effect of the anthelmintic? *Helminthologia* 34: 147-153.
- Velebný S., Hřčková G., Tomašovičová O. 2000. *Toxocara canis* in mice: effect of stabilized liposomes on the larvacidal efficacy of fenbendazole and albendazole. *Helminthologia* 7: 195-198.

Zaakceptowano do druku 30 maja 2004