

WRAŻLIWOŚĆ PEŁZAKÓW GRUPY „LIMAX” NA WYBRANE LEKI PRZECIWPASOŻYTNICZE II. BADANIA IN VIVO *

TADEUSZ MAZUR, WITOLD KASPRZAK I GRAŻYNA ZAGÓRSKA-NOWAK

Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Instytutu Biostruktury AM, Poznań

Wcześniejsze badania (Mazur i wsp., w druku) przeprowadzone in vitro sugerują ewentualną skuteczność paromomycyny i polimyksyny B w leczeniu inwazji pełzaków grupy „limax”. Dlatego niniejsza praca jest kontynuacją poprzednich badań, a jej celem badanie skuteczności terapeutycznej tych antybiotyków in vivo. Amfoterycynę B zastosowano w niniejszych badaniach jako kontrolny lek o znanym działaniu pełzakobójczym w odniesieniu do *Naegleria fowleri*.

Material i metody

Szczepy pełzaków

Do tych badań wytypowano trzy szczepy o znacznie nasilonej wirulencji, a mianowicie:

Acanthamoeba sp. (1219), szczep własny, izolowany ze środowiska wodnego, patogenny dla myszy.

Naegleria fowleri (Vitek) **, szczep patogenny dla ludzi i zwierząt, izolowany przez Červę (1969) ze śmiertelnego przypadku PAM.

Naegleria fowleri (HB-1) **, szczep patogenny dla ludzi i zwierząt, izolowany przez Butta (1966) ze śmiertelnego przypadku PAM.

Podłoża hodowlane ***

Szczep *Acanthamoeba* sp. utrzymywano w hodowli na stałym podłożu agarowym NNE wg Culbertsona i wsp. (1965), natomiast szczep *N. fowleri* na podłożu płynnym BCS wg Červy (1966; 1969).

* Praca częściowo subwencionowana przez komitet Parazytologii PAN.

** Szczep otrzymano od dr L. Červy, Czechosłowacka Akademia Nauk, Sekcja Protozoologii, Praga, Czechosłowacja.

*** Opisy przedstawiono w I części pracy.

Myszy używane do doświadczeń, rasy Swiss, chowu wsobnego, w każdej serii doświadczeń stanowiące jeden miot, były obu płci, w wieku ok. 3 tygodni i wagi 8-12 g.

Przygotowanie inokulatów

Kontrolę wzrostu *N. fowleri* (Vitek i HB-1) w podłożu płynnym prowadzono za pomocą mikroskopu z tubusem horyzontalnym. Dobrze wzrastające, czterodniowe kultury pełzaków wytrząsano na mikrowytrząsarce w celu oderwania pełzaków od ścianek probówek hodowlanych. Po tej manipulacji, zawartość probówek przenoszono do jałowej probówki wirówkowej i wirowano przez 8 minut przy 1,5 tys. obr./min. Po odwirowaniu jałowo odpipetowywano supernatant, pozostawiając na dnie osad pełzaków w niewielkiej ilości pożywki. Tak przygotowanym inokulatem po przetrzymaniu ok. 10 minut w cieplarni (37°C), zarażano myszy. W lekkiej narkozie eterowej, wkraplano im donosowo przygotowaną zawiesinę pełzaków o objętości 0,2-0,03 ml, tj. około 15-20 tys. pełzaków.

W przypadku szczepu *Acanthamoeba* sp. (1219), trofozoity w trzecim dniu inkubacji na podłożu stałym NNE, splukiwano sterylną wodą i zlewano do probówki wirówkowej. Następnie postępowano identycznie jak w przypadku szczepów *N. fowleri*.

Antybiotyki

Amfoterycyna B (Amphotericin B — Fungizone) prod. Squibb, USA.

Paromomycyna (Paromomycine — Cl — 358) prod. Parke and Davis CO., USA.

Polimyksyna B (Polymyxin B sulfate) prod. Pficer Inc., N. York, USA.

Amfoterycynę B i paromomycynę rozpuszczano w 5% glukozie i podawano myszom dootrzewnowo: amfoterycynę B po 0,1 ml leku w dawkach 7,5 mg/kg wagi ciała, a paromomycynę w ilości 0,1 ml w dawkach 75 mg/kg wagi ciała.

Polimyksynę B rozpuszczano w fizjologicznym NaCl i 0,1 ml podawano myszom domięśniowo w dawkach 5 mg/kg wagi ciała.

Technika prowadzenia badań

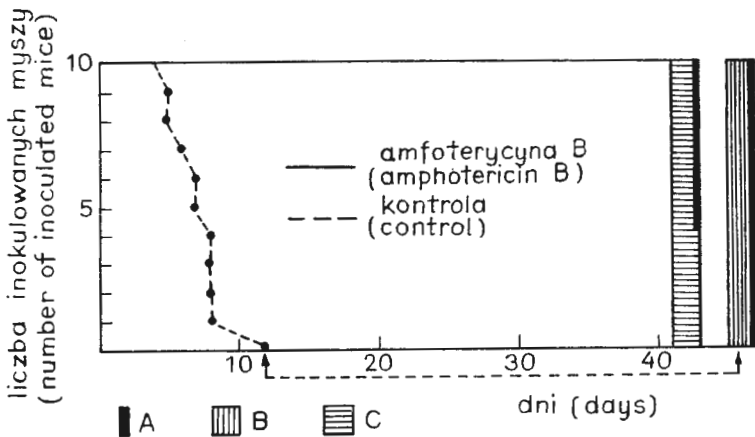
Leki podawano myszom przez 10 kolejnych dni, przy czym pierwszym dniem podawania leków był dzień poprzedzający zarażenie. Myszy kontrolne nie były leczone. Zwierzęta przetrzymywane w temperaturze 21-24°C otrzymywały standardową karmę i wodę ad libitum.

W wypadku padnięcia myszy robiono posiewy z mózgowia i płuc na podłoże NNE; inkubowano w temp. 37°C. Kontrolę mikroskopową prowadzono przez 6 dni. Jeśli myszy przeżywały 40 dni, zabijano je eterem; z mózgowia i płuc wykonywano posiewy na podłoże NNE i przez 6 dni kontrolowano pod mikroskopem j.w.

Wyniki

Leczenie negleriozy

Na rycinach 1, 2 i 3 przedstawiono wyniki leczenia myszy зараżonych eksperymentalnie *N. fowleri* (szczep Vitek). Najlepsze wyniki dało leczenie amfoterycyną B (ryc. 1). Żadna z leczonych tym antybiotykiem myszy nie padła w okresie do 40 dnia, natomiast nie leczone myszy kontrolne padły wszystkie w ciągu 12 dni. Jednocześnie jednak u sześciu z dziesięciu leczonych po okresie 40 dni stwierdzono obecność pełzaków w mózgowiu. Pozostałe 4 myszy, u których nie stwierdzono pełzaków, uznano za całkowicie wyleczone.



Ryc. 1. Wpływ amfoterycyny B na myszy eksperymentalnie zarażone *N. fowleri* (szczep Vitek). Myszy które: A — uległy inwazji, B — padły, C — przeżyły

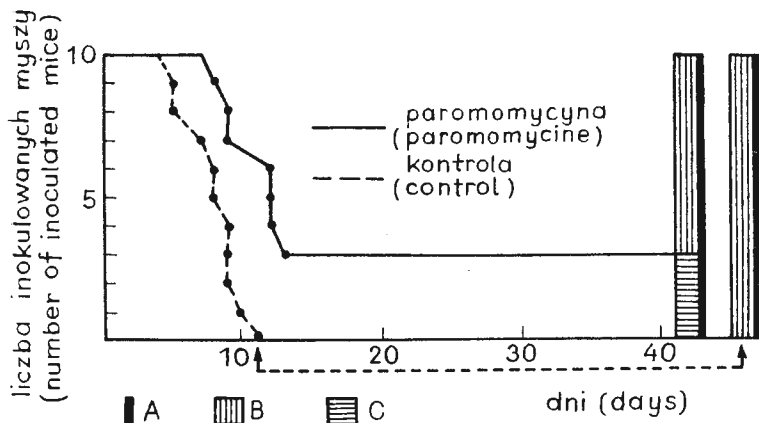
Fig. 1. The effect of amphotericin B on mice experimentally infected with *N. fowleri* (strain Vitek). The number of mice: A — infected, B — died, C — survived

Nieco gorsze wyniki uzyskano w grupie myszy leczonych paromomycyną (ryc. 2). W okresie 12 dni padło 7 leczonych i wszystkie kontrolne. U wszystkich myszy, które padły, dokonując posiewu tkanek na podłożu NNE stwierdzono obecność pełzaków w mózgowiu. U pozostałych trzech leczonych myszy, które przeżyły inwazję w ciągu 40 dni, stwierdzono również obecność pełzaków w mózgowiu. Nie zanotowano więc ani jednego przypadku całkowitej likwidacji pełzaków w organizmie zarażonych zwierząt.

Z dziesięciu myszy leczonych polimyksyną B (ryc. 3) przeżyło sześć, natomiast z takiej samej liczby kontrolnych przeżyła jedna. Zarówno u tych, które przeżyły inwazję, jak i u tych, które padły, stwierdzono obecność pełzaków w mózgowiu. Chociaż liczba myszy leczonych poli-

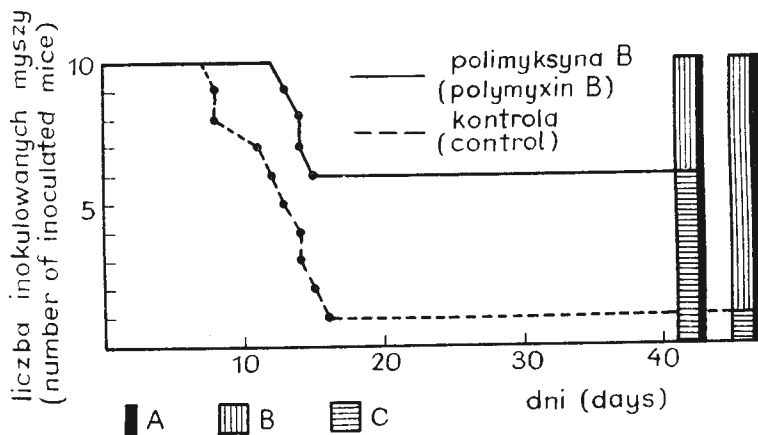
myksyną B, które przeżyły, była większa (6 myszy) niż w grupie leczonych paromomycyną (3 myszy), to jednak i w tym przypadku żadna z nich nie została całkowicie wyleczona.

W przypadku paromomycyny i polimyksyny B myszy leczone padały w nieco późniejszym okresie niż myszy nie leczone (przesunięcie o 3-5 dni początku okresu padania).



Ryc. 2. Wpływ paromomycyny na myszy eksperymentalnie zarażone *N. fowleri* (szczep Vitek). Myszy które: A — uległy inwazji, B — padły, C — przeżyły

Fig. 2. The effect of paromomycin on mice experimentally infected with *N. fowleri* (strain Vitek). The number of mice: A — infected, B — died, C — survived



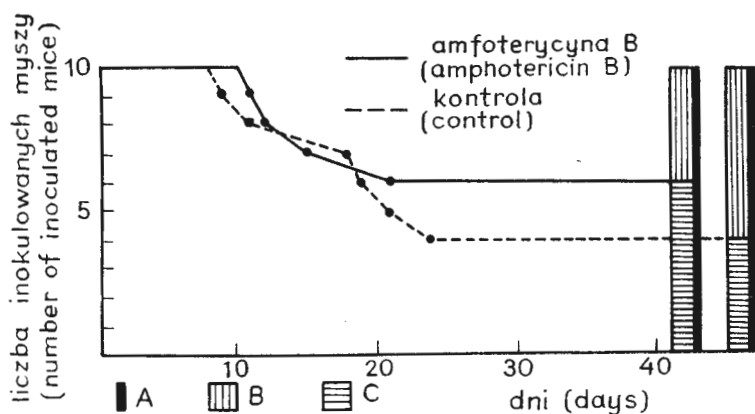
Ryc. 3. Wpływ polimyksyny B na myszy eksperymentalnie zarażone *N. fowleri* (szczep Vitek). Myszy które: A — uległy inwazji, B — padły, C — przeżyły

Fig. 3. The effect of polymyxin B on mice experimentally infected with *N. fowleri* (strain Vitek). The number of mice: A — infected, B — died, C — survived

Podobne wyniki leczenia uzyskano u myszy zarażonych drugim szczepem *N. fowleri* (HB-1). Różnica polegała jedynie na tym, że szczep ten w warunkach kontrolnych, tzn. bez leczenia, spowodował śmierć jedynie 60% zarażonych myszy. Dlatego też efekt leczenia był mniej widoczny niż w przypadku *N. fowleri* szczepu Vitek, który w warunkach kontrolnych wykazywał większą wirulencję.

Leczenie akantamebiozy

Ryc. 4 przedstawia wynik leczenia myszy amfoterycyną B. Przebieg inwazji *Acanthamoeba* sp. u myszy leczonych i nie leczonych w początkowym okresie inwazji jest podobny; w obu wypadkach do 20 dnia padła



Ryc. 4. Wpływ amfoterycyny B na myszy eksperymentalnie zarażone *Acanthamoeba* sp. (szczep 1219). Myszy które: A — uległy inwazji, B — padły, C — przeżyły

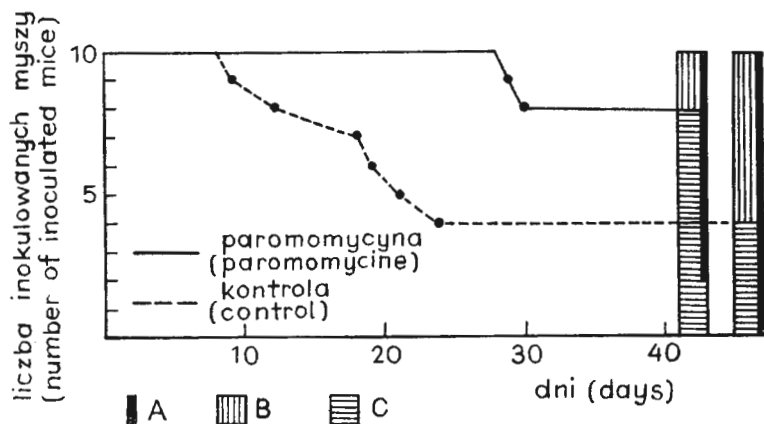
Fig. 4. The effect of amphotericin B on mice experimentally infected with *Acanthamoeba* sp. (strain 1219). The number of mice: A — infected, B — died, C — survived

ta sama liczba zwierząt (4). W ciągu następných sześciu dni w grupie zwierząt kontrolnych padły jeszcze dwie myszy. Wynika z tego, że efekt leczenia akantamebiozy amfoterycyną B jest bez porównania gorszy niż to miało miejsce przy leczeniu negleriozy. U wszystkich myszy, zarówno u tych, które padły, jak i u tych, które przeżyły, stwierdzono obecność pełzaków w mózgowiu oraz w siedmiu przypadkach w płucach.

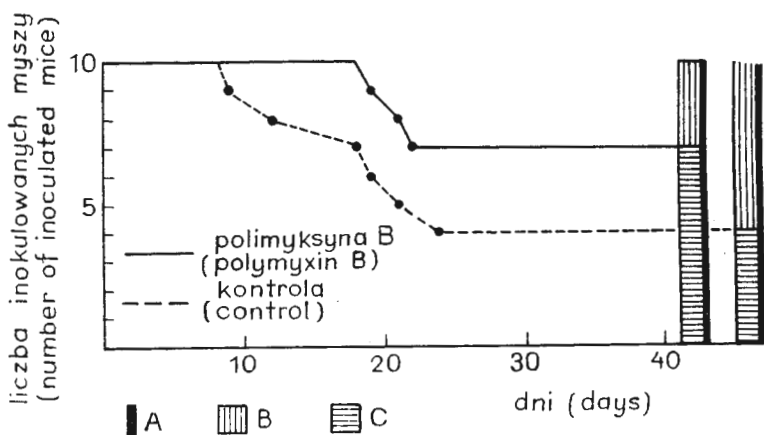
Znacznie lepsze wyniki uzyskano lecząc zwierzęta paromomycyną (ryc. 5). W grupie kontrolnych pierwsza mysz padła w 9 dniu, a w grupie leczonych dopiero w 28 dniu od zarażenia. W rezultacie spośród dziesięciu myszy leczonych paromomycyną przeżyło osiem i u dwóch z nich nie stwierdzono pełzaków w mózgowiu ani w płucach. Świadczy to o całkowitym ich wyleczeniu. U pozostałych sześciu myszy, jak i u dwóch które padły, pełzaki stwierdzono w mózgowiu, a u czterech w płucach. W grupie zwierząt kontrolnych przeżyły 4, lecz u wszystkich, podobnie

jak tych, które padły, stwierdzono obecność pełzaków zarówno w mózgowiu, jak i w płucach.

W przypadku leczenia zwierząt polimyksyną B (ryc. 6) uzyskano wyniki gorsze niż poprzednio. Z grupy zwierząt leczonych, począwszy od 19 dnia po zarażeniu padły trzy myszy, a u tych, które przeżyły inwazję stwierdzono obecność pełzaków zarówno w mózgowiu jak i w płucach.



Ryc. 5. Wpływ paromomycyny na myszy eksperymentalnie zarażone *Acanthamoeba* sp. (szczep 1219). Myszy które: A — uległy inwazji, B — padły, C — przeżyły
 Fig. 5. The effect of paromomycin on mice experimentally infected with *Acanthamoeba* sp. (strain 1219). The number of mice: A — infected, B — died, C — survived



Ryc. 6. Wpływ polimyksyny B na myszy eksperymentalnie zarażone *Acanthamoeba* sp. (szczep 1219). Myszy które: A — uległy inwazji, B — padły, C — przeżyły
 Fig. 6. The effect of polymyxin B on mice experimentally infected with *Acanthamoeba* sp. (strain 1219). The number of mice: A — infected, B — died, C — survived

W grupie dziesięciu myszy kontrolnych przeżyły 4, ale u wszystkich dziesięciu stwierdzono obecność pełzaków w mózgowiu i płucach. Podawanie polimyksyny B wpływa przede wszystkim na znaczne przedłużenie okresu padania myszy zarażonych *Acanthamoeba* sp.; w grupie kontrolnej okres ten trwał od 9-25 dnia a w grupie zwierząt leczonych od 19-22 dnia od zarażenia.

Dyskusja

Bywa, że spośród wielu leków zbadanych *in vitro* na dalsze badania *in vivo* zasługują tylko niektóre, a to z uwagi na mierny efekt terapeutyczny uzyskany w doświadczeniu *in vitro*. Nawet w przypadku leków wykazujących skuteczne działanie pasożytoobójcze *in vitro*, działanie to nie okazuje się adekwatne do wyników badań *in vivo*. Nie dotyczy to jednak amfoterycyny B, która zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* wykazuje skuteczne działanie pełzakobójcze wobec szczepów z rodzaju *Naegleria* (Culbertson i wsp., 1968; Carter, 1969; Das, 1971; Duma, 1971; Chang, 1971; Schuster i Rechthand, 1975).

Amfoterycynę B różni badacze stosowali w różnych dawkach. Das (1971) utrzymuje, że 30 mg/kg wagi ciała daje 100% zabezpieczenie przed padaniem myszy. Mniejszą dawkę, bo 0,15 mg na jedną mysz, stosowali przy równoczesnym podawaniu sulfadiazyny Culbertson i wsp. (1968), co powodowało przeżywanie inwazji przez znaczną część leczonych myszy w porównaniu z kontrolnymi. Jeszcze niższe dawki, bo ok. 0,075 mg na mysz stosował Carter (1969). Dawka ta wydaje się optymalna, ponieważ analiza surowicy krwi myszy wykazała, że poziom leku (1,2 µg/ml) jest identyczny jak w surowicy ludzkiej, po dożylnym podawaniu leku (Goodman i Cilman, 1965). Z kolei Thong i wsp. (1979 A, 1979 B) stosowali dawki 2,5 mg/kg, lecz odsetek myszy, które przeżywały inwazję wahał się od 10 do 37 w różnych doświadczeniach. Równoczesne stosowanie różnych dawek rifamycyny lub tetracykliny powodowało zwiększenie odsetka przeżywających myszy od 40 do 87,5%.

W niniejszej pracy, po podaniu amfoterycyny B w dawce 7,5 mg/kg wagi ciała, przeżyły wszystkie myszy zarażone szczepami *N. fowleri*. Stwierdzono również zgodność efektów działania amfoterycyny B z wynikami poprzednich badań *in vitro* (Mazur i wsp., w druku).

Natomiast antybiotyk ten nie okazał się pełzakobójczy wobec przedstawicieli rodzaju *Acanthamoeba*. Inwazja ośrodkowego układu nerwowego przez pełzaki tego rodzaju następuje najprawdopodobniej drogą układu krążenia z pierwotnego miejsca inwazji, tj. z płuc. W tej pracy, zarówno u zwierząt leczonych jak i kontrolnych, — tych które padły lub przeżyły — stwierdzano często pełzaki w płucach. Być może mała wrażliwość pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* na lek, jak i fakt istnienia

stałego źródła przerzutów do ośrodkowego układu nerwowego sprawia, że efekty leczenia są znikome. Z badań Kasprzaka i wsp. (1974) wynika, że wśród szczepów omawianego rodzaju znajdują się takie, które wykazują tendencję wybiórczego inwadowania płuc (szczepy pneumotropowe). Być może, że te różne właściwości szczepów *Acanthamoeba* stosowanych w badaniach chemioterapeutycznych są nieraz powodem nieporównywalności wyników badań różnych autorów (Nagington i Richards, 1976; Červa, 1969; Casemore, 1970). Wcześniejsze badania *in vitro* (Mazur i wsp., w druku) potwierdzają tę mniejszą wrażliwość *Acanthamoeba* na amfoterycynę B; dawki hamujące wzrost tych pełzaków były około 1000 razy większe od dawek hamujących wzrost szczepów *Naegleria*.

Paromomycyna, antybiotyk z grupy neomycyn, wykazywała jedynie nieznaczne właściwości pełzakobójcze w stosunku do obu szczepów *N. fowleri*. Należy przypomnieć, że w badaniach *in vitro* dla uzyskania zahamowania wzrostu szczepów *Naegleria* konieczne było 11-krotne zwiększenie dawki skutecznej wobec szczepów *Acanthamoeba*. Natomiast z trzech zbadanych w tej pracy preparatów, paromomycyna okazała się jedynym skutecznym lekiem w przypadkach inwazji *Acanthamoeba* sp. u myszy; stwierdzano niejednokrotnie pełne wyleczenie, a okres przeżywania ulegał zdecydowanemu przedłużeniu. Jednakże i w przypadku tego leku stwierdzano obecność pełzaków zarówno w mózgowiu jak i w płucach, również u części zwierząt leczonych, które przeżyły inwazję. Wyniki te są zbieżne z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi w badaniach *in vitro* (Mazur i wsp., w druku); z trzech badanych był to jedyny lek działający w stosunkowo niskich stężeniach na szczepy *Acanthamoeba*.

Zbliżone wyniki otrzymał Červa (1969), który badając szereg preparatów stwierdził, że tylko paromomycyna może być brana pod uwagę w badaniach na zwierzętach. Również Casemore (1970) i Nagington i Richards (1976) stwierdzają na podstawie badań *in vitro*, że paromomycyna zasługuje na przesłedzenie jej właściwości pełzakobójczych w doświadczalnych inwazjach z *Acanthamoeba*.

Najsłabsze działanie pełzakobójcze wykazywała w tych badaniach polimyksyna B, zarówno w odniesieniu do obu szczepów *Naegleria*, jak i szczepu *Acanthamoeba*. Odmienne opinie o pełzakobójczych właściwościach polimyksyny B wyrażają Casemore (1970) oraz Nagington i Richards (1976), którzy w swoich badaniach obserwowali zachowanie się szczepów *Acanthamoeba*. Wydaje się jednak, o czym uprzednio wspomniano, że odmienne wyniki badań chemioterapeutycznych różnych autorów, mogą być w części spowodowane stosowaniem szczepów *Acanthamoeba* o odmiennych właściwościach. Wyniki niniejszej pracy pozostają jednak w zgodności z wynikami poprzednich badań *in vitro* (Mazur i wsp., w druku); polimyksyna B wykazywała najslabsze działanie pełza-

kobójcze. Należy dodać, że badania te były prowadzone na różnych szczepach obu rodzajów, lecz uzyskane wyniki były identyczne w przypadku wszystkich tych szczepów.

Wyniki naszych badań, poza potwierdzeniem znanej skuteczności amfoterycyny B w leczeniu inwazji *N. fowleri*, wskazują jednocześnie na brak takiego działania w inwazjach wywołanych przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*. Tę wybiórczą wrażliwość pełzaków na różne antybiotyki potwierdza fakt w miarę skutecznego likwidowania inwazji *Acanthamoeba* za pomocą paromomycyny, przy jednoczesnym braku efektu w negleriozie. Mając na uwadze dużą toksyczność obu antybiotyków, należy podkreślić znaczenie jakiego w tej sytuacji nabierają badania nad synergistycznym działaniem leków (Culbertson i wsp., 1968, Thong i wsp., 1979 A; 1979 B); być może pozwolą one na uzyskanie znacznych efektów terapeutycznych przy stosowaniu obniżonych dawek.

W doświadczalnej negleriozie wykazano (Adams i wsp., 1976), że nie tylko leki jako związki chemiczne, ale również endotoksyny produkowane przez *Escherichia coli* oraz kompleksy endotoksyn z białkiem-nośnikiem, mogą działać osłaniająco w początkowej fazie inwazji. I jeśli nawet w późniejszym okresie inwazji nie było znaczącej różnicy w przeżywaniu, to jednak wyniki tych doświadczeń dają nadzieję, że skutecznego leku przeciw negleriozie i akantamebiozie należy szukać także poza ścisłym kręgiem chemii.

Otrzymano: 18 I 1982

Adres autorów:
61-701 Poznań, Fredry 10

SENSITIVITY OF LIMAX AMOEBAE TO SOME ANTI-PARASITIC DRUGS. II. ACTIVITY IN VIVO

by

T. MAZUR, W. KASPRZAK AND G. ZAGÓRSKA-NOWAK

The activity of paromomycin, polymyxin B and amphotericin B in mice experimentally infected with *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba castellanii* strains has been tested.

The high efficacy of amphotericin B in mice infected with *N. fowleri* was observed; doses 7,5 mg/kg/day were curative for all animals infected. In most of them the search for amoebae in the brain tissues was negative. On the other hand the effect of this drug on the course of *Acanthamoeba* infection was insignificant and consisted in an inappreciable prolongation of the survival period.

In mice infected with *A. castellanii* paromomycin had high efficacy in doses of 75 mg/kg/day; search for amoebae in the tissues of most mice was negative and the survival period was considerably prolonged. This drug was less effective for *Naegleria* infection; although the number of mice survived was increased and

the survival period was prolonged, amoebae were found in the brain of all animals.

Polymyxin B given in doses of 5 mg/kg/day was less effective in mice infected both with *N. fowleri* and *A. castellanii*. Only an insignificant percentage of mice that survived the infection and a somewhat prolonged period of survival was observed.