

Ocena zmian patomorfologicznych skóry świnek morskich leczonych itrakonazolem po zakażeniu grzybem *Trichophyton mentagrophytes*

JACEK PIÓRKOWSKI

Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Piórkowski J.

Estimation of pathomorphological skin changes in guinea pigs after itraconazole treatment during infection with *Trichophyton mentagrophytes*

Summary

The aim of the research was to investigate the possibility of using oral medicines for the treatment of animals with skin mycoses. The administration of oral azole antifungal Itraconazole was conducted on guinea pigs. In the light microscopy investigation during treatment of guinea pigs with Itraconazole, mycelium were not observed 4 days after the time of the administration of the drug, both in the stratum corneum of the epidermis and in hair sheaths. Neither was mycelium confirmed in the subcutaneous layer. Only parakeratose, hyperkeratose was observed, as well as a small degree of akantose. The investigation with the use scanning microscope made it possible to additionally affirm the presence on the top of scraps of spherical forms the accumulations of drops of fat which is characteristic for azole antifungals. The administration of oral azole antifungal causes the rapid regression of pathological changes in the deep layers of the skin. Therapy of this type can be useful in veterinary medicine.

Keywords: guinea pigs, itraconazole, *Trichophyton mentagrophytes*, skin mycosis

Wzrost infekcji grzybiczych na przestrzeni ostatnich lat powoduje znaczne zainteresowanie lekami przeciwgrzybiczymi stosowanymi w infekcjach skórnych. Obserwowany zarówno w Polsce, jak i na całym świecie wyraźny wzrost grzybic skórnych wymaga poszukiwania leków coraz bardziej skutecznych. Leki stosowane w terapii miejscowej oraz ogólnej charakteryzują się szerokim spektrum działania, wysoką skutecznością i dużym bezpieczeństwem stosowania. Decyzja o stosowaniu leczenia doustnego u zwierząt powinna uwzględniać dokładną analizę procesu chorobowego, charakter zmian oraz jego nasilenie. Istotną kwestią jest możliwość penetracji leku w głąb skóry do miejsca ogniska chorobowego. Wady i zalety wynikające ze stosowania leków miejscowych oraz doustnych zostały opisane przez Degreeef (4). Zalety w stosowaniu leków doustnych nie tylko u zwierząt doświadczalnych wiążą się z rozległym przenikaniem przez skórę, która jest niemal zawsze nieodłączną przeszkodą w stosowaniu leków miejscowych w przypadku uszkodzeń o dużym nasileniu (6). Czynnikiem decydującym o wyborze pomiędzy miejscowym a doustnym leczeniem pozostaje zawsze skuteczność w stosowaniu zaplanowanego leczenia, a to z kolei zależy od rodzaju użytego leku oraz jego biodostępności.

Celem badań była ocena zmian patomorfologicznych skóry u świnek morskich zakażonych grzybem *Trichophyton mentagrophytes* i poddanych leczeniu Itrakonazolem (Orungal prod. Janssen Pharmaceutica N.V., Belgia).

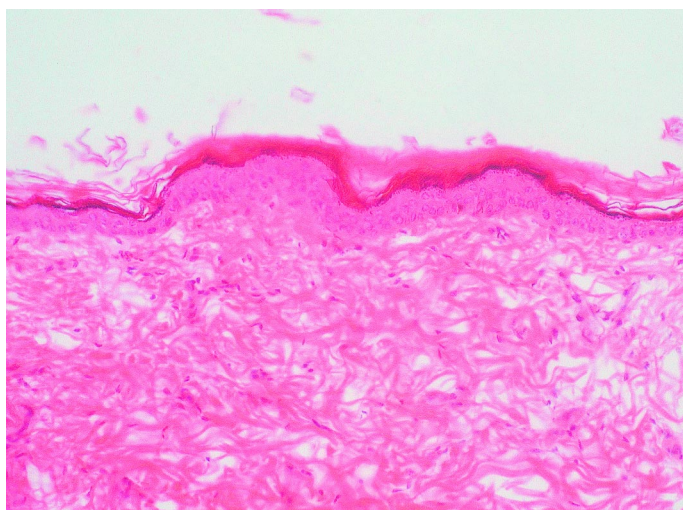
Materiał i metody

Doświadczenie wykonano u 51 świnek morskich o masie ciała 300-350 g. Poddano je depilacji w okolicy prawego podudzia. Inokulacji w grupie L (zwierzęta przeznaczone do leczenia, 21 szt.) dokonano zawiesiną grzyba *Trichophyton mentagrophytes* var. 58 w dawce 8×10^6 ml⁻¹ (cfu) i w ilości 0,3 ml w okolicę prawego podudzia na pole o powierzchni 2 cm × 2 cm. Grupa zwierząt zakażonych oznaczona jako Z i licząca 21 świnek morskich obejmowała zwierzęta zakażane tym samym szczepem grzyba, w tej samej dawce i w identyczny sposób. Grupa kontrolna (K) zwierząt zdrowych obejmowała 9 świnek morskich. Po uprzednio dokonanej depilacji w okolicy prawego podudzia wcierano roztwór płynu fizjologicznego w ilości 0,3 ml. Zwierzęta ze wszystkich 3 grup usypiane były w narkozie eterowej w odstępach 4-dniowych.

Zwierzętom z grupy L podawano doustnie (podjęzykowo) lek azolowy Itrakonazol (Orungal prod. Janssen Pharmaceutica N.V., Belgia) w dawce 1,5 mg/kg masy ciała,

tn. w ilości około 0,5 mg na jedną świnkę morską. Lek podawano raz dziennie trzeciego dnia od momentu zakażenia i terapię prowadzono przez okres kolejnych 14 dni.

Do badań w mikroskopie świetlnym i skaningowym pobierano wycinki skóry o wymiarach 2 cm × 2 cm. Z materiału utrwalonego w 10% obojętnym formolu sporządzono skrawki metodą parafinową, z których wykonywano preparaty mikroskopowe. Dla oceny morfologicznej pobranego materiału w mikroskopie świetlnym skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną oraz metodą PAS wg Mc Manusa, co pozwoliło na określenie obecności grzyba w tkance. Wykonano również barwienie orceiną celem określenia stopnia działalności elastolitycznej grzyba i ewentualnej penetracji w głąb tkanki. Preparaty przeznaczone do badań w mikroskopie skaningowym utrwalane były w 4% aldehydzie glutarowym o pH 7,4 w buforze fosforanowym przez 48 h w temp. 22°C. Materiał następnie odwadniano w różnych seriach stężeń acetonu, a w końcowej fazie w acetonie 100%. Preparaty poddano napyleniu warstwą złota. Oglądanie przeprowadzono przy użyciu mikroskopu skaningowego Tesla BS-300.



Ryc. 1. Prawidłowa budowa skóry (grupa kontrolna). Barw. HE. Pow. 100 ×

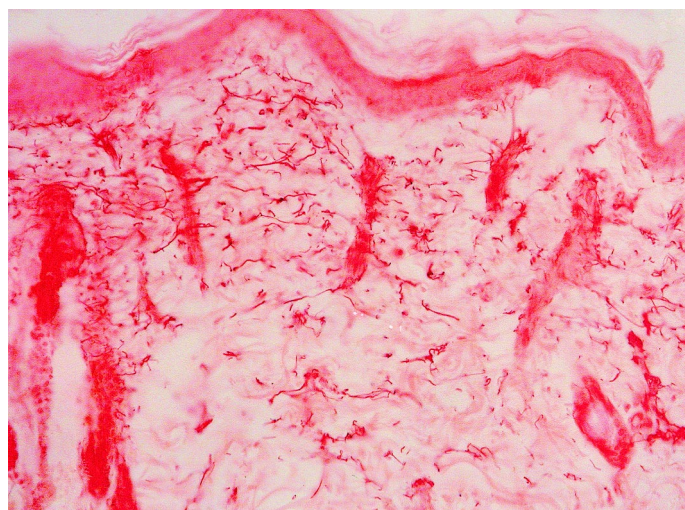


Ryc. 3. Grzybnia w powierzchniowej warstwie zrogowaciałego naskórka w 3. dniu po zakażeniu. Strzałką zaznaczono obecność grzybnia. Barw. PAS. Pow. 200 ×

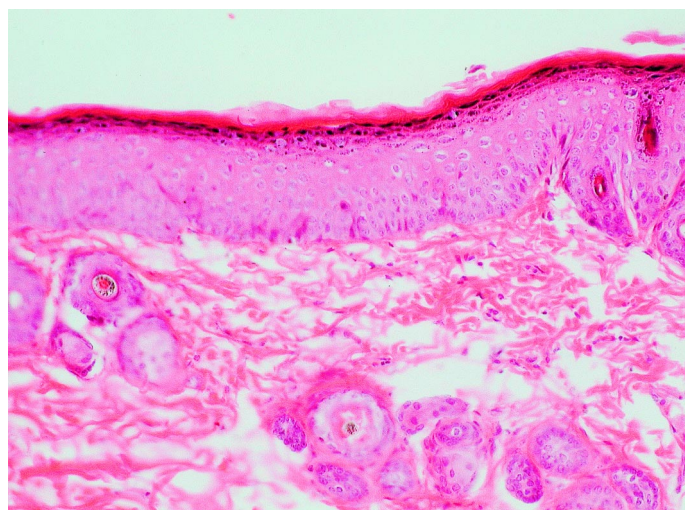
Wyniki i omówienie

W grupie kontrolnej świnek morskich w preparatach histologicznych ze skóry stwierdzono obecność naskórka o prawidłowej grubości i strukturze z mierzalnymi oznakami rogowacenia (ryc. 1). W barwieniu orceiną wykazano sieciowy układ ciemnobrunatnych włókien elastycznych, które były wyraźnie zagęszczone w warstwie podnaskórkowej i uległy rozrzedzeniu w kierunku głębszych warstw skóry i tkanki podskórnej (ryc. 2).

W grupie zwierząt zakażonych (Z) stwierdzono natomiast wyraźne nasilenie zmian histopatologicznych w postaci hyperkeratozy, parakeratozy i akantozy naskórka oraz obecność strzępek grzybnia szczególnie w 7., 11. i 15. dniu od momentu inokulacji. Zaobserwowano również obecność wynaczynień podnaskórkowych, nacieków złożonych monocytów, limfocytów, komórek plazmatycznych, makrofagów oraz neutrofilii tworzących mikroropnie oraz zropienia cebulek i pochewek włosa.



Ryc. 2. Zagęszczenie włókien elastycznych w warstwie podnaskórkowej. Barw. orceiną. Pow. 100 ×



Ryc. 4. Hyperkeratoza komórek naskórka w 3. dniu po zakażeniu. Barw. HE. Pow. 100 ×

W grupie zwierząt leczonych (L) oceny preparatów histologicznych dokonano w analogicznych okresach jak w grupie poprzedniej. W 3. dniu po zakażeniu stwierdzono obecność grzyba penetrującego do powierzchniowych warstw zrogowaciałego naskórka (ryc. 3). Zmiany histopatologiczne ograniczały się tylko do naskórka i wyrażały się nadmiernym rogowaceniem, parakeratozą oraz nieznaczną akantozą (ryc. 4). W komórkach naskórka widoczne były oznaki proteolizy w postaci zwyrodnienia wodniczkowego. W skórze właściwej brak było zmian przy obecności prawidłowych włosów i pochewek włosowych. Stwierdzono również brak zmian w tkance podskórnej. W 7., 11. oraz 15. dniu od momentu zakażenia nie stwierdzono obecności grzyba, natomiast zmiany histopatologiczne w naskórku podobne były do zmian w 3. dniu obserwacji i utrzymywały się do 11. dnia obserwacji począwszy od momentu zakażenia. W skórze właściwej i tkance podskórnej nie stwierdzono zmian. Włosy i pochewki włosowe były nie uszkodzone. Począwszy od 15. dnia do 27. dnia od momentu zakażenia nie obserwowano w skórze grzyba, a budowa histologiczna naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej była prawidłowa.

W preparatach ocenianych w mikroskopie skaningowym stwierdzono w obrębie wierzchołków grzybni obecność nieregularnych kulistych form gromadzących krople tłuszczu (ryc. 5).

Dużą skutecznością w zwalczaniu dermatofitoz charakteryzują się pochodne azolowe trzech generacji. Pierwszą z nich stanowią: ekonazol, mikonazol, klotrimazol, isokonazol; drugą stanowią: tiokonazol, oxiconazol, bifonazol, ketokonazol. Do trzeciej generacji zalicza się: flukonazol, terakonazol oraz itrakonazol. Wszystkie te preparaty posiadają dużą aktywność miejscową oraz charakteryzują się szerokim zakresem działania ogólnego. Obecnie największą popularnością cieszą się w leczeniu ogólnym pochodne trzeciej generacji. Działanie ich polega na hamowaniu aktywności C_{14} -alfa-demetylasy, enzymu zależnego od cytochromu P-450, odpowiedzialnego za konwersję lanosterolu do ergosterolu, zaliczanego do głównego sterolu większości błon komórkowych grzybów, co prowadzi do zmiany struktury ściany komórki grzyba i czyni ją wrażliwą na uszkodzenia (3, 5, 7).

Stosowanie leków przeciwgrzybiczych *per os* stanowi duży postęp w leczeniu głębokich i szeroko rozpowszechnionych grzybic skórnych, jednakże w przypadku grzybic powierzchniowych zmiany histopatologiczne dotyczą głównie powierzchniowych warstw naskórka. Czynnikiem decydującym o wyborze leczenia jest sposób umiejscowienia grzybni, gdzie grzybnia występuje w warstwie powierzchniowej lub też umiejscowienie głębsze, obejmujące trzon oraz pochewkę włosa (12). W przypadku braku dostępu leku do głębszych warstw skóry rozwijająca się tam grzybnia stanowi pewnego rodzaju rezerwuar, z którego dokonuje się namnażanie do warstwy rogowej i stąd,



Ryc. 5. Strzępek grzybni z kulistą formą gromadzącą krople tłuszczu. Mikroskop skaningowy. Pow. 3100 ×

między innymi, wynika często nieustająca infekcja. Efektywność itrakonazolu w leczeniu grzybic doświadczalnych, lecz z pominięciem obserwacji zmian strukturalnych stwierdzili też inni autorzy (11, 14, 16-18). W leczeniu grzybic u ludzi szczególną uwagę zwraca się na stosowanie itrakonazolu w tzw. terapii pulsowej (10). Badania własne wskazują na likwidację grzybni w tkance począwszy od 4. dnia od momentu zastosowania leku oraz na brak uszkodzeń wcześniej powodowanych przez grzyb. Wcześniejsze obserwacje dokonane przez innych autorów potwierdzają również ten fakt i wskazują na obecność zmian w obrębie ściany komórkowej grzybni już po 1 dniu od momentu zastosowania leków azolowych (2). Istotnym spostrzeżeniem może być fakt wskazujący, że doustne podawanie leków powoduje zahamowanie inwazyjności grzyba do wnętrza struktury włosa. Podobne oddziaływanie na grzybnię miało miejsce w odniesieniu do kandydiozy pochwy (8). Katz (9) wskazuje, że itrakonazol oraz ketokonazol wymagają kwaśnego środowiska dla optymalnego wchłaniania, a wywołana innymi lekami redukcja odczynu pH żołądka może spowodować zmniejszenie biodostępności itrakonazolu. Rashid i wsp. (15) obserwowali wpływ terbinafiny na *Trichophyton mentagrophytes* w doświadczeniu przeprowadzonym na żywym modelu skóry człowieka. Za pomocą mikroskopu skaningowego wykazali oni adhezję artrokonidiów do keratynocytów oraz włókien kolagenowych. Po 2 dniach od zakażenia niektóre artrokonidia zaczynały kiełkować, a po 6 dniach

obserwowano obfity wzrost grzybni, której strzępki wnikały w szczeliny i pory na powierzchni naskórka oraz w obrębie zrębu kolagenowego. Dodatek do podłoża terbinafiny w ilości 0,1 mg/l spowodował rozszerzenie i zniekształcenie strzępków, które robiły wrażenie pustych. Zauważyli oni także przerwy w ciągłości strzępków. Obraz podobny zaobserwowano w badaniach własnych, gdzie zastosowanie itraconazolu *per os* doprowadziło do deformacji strzępków i powiększenia ich objętości w wyniku gromadzenia kropli tłuszczu, co potwierdzono w mikroskopie skaningowym. Podczas stosowania leku nie stwierdzono wzrostu grubości naskórka, szczególnie pod koniec okresu leczenia, co może wskazywać na brak procesu zapalnego. W leczeniu weterynaryjnym najczęściej stosowane są preparaty miejscowe. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że leczenie miejscowe powoduje uszkodzenie wyłącznie grzybów obecnych w warstwie rogowej, pozostawiając grzybnię nieuszkodzoną w obrębie korzenia włosa. Miejscowe stosowanie leków nie chroni włosów przed inwazją grzybów w szczególności do trzonu włosa. Preparaty stosowane miejscowo nie wnikają do głębszych warstw, co może wynikać z nieodpowiedniej ich biodostępności. Przyczyną tego może być biodegradacja dużych ilości lipidów oraz protein. Zwraca się także uwagę na obecność surowicy, która może wywierać działanie hamujące na leki lipofilne imidazolowe działające miejscowo – mikonazol i clotrimazol (1).

Dobra kinetyka itraconazolu wiążąca się z dostępnością i gromadzeniem się jego w różnych miejscach w skórze oraz w naskórku jest czynnikiem odpowiadającym za eliminację grzyba z głębszych warstw skóry (13). Poddając ocenie leki działające miejscowo czy też ogólnie należy brać pod uwagę nie tylko zalecane schematy postępowania odnośnie do czasu leczenia oraz dawkowania, lecz także siłę działania leku, co może wynikać z możliwości penetracji jego i gromadzenia się w warstwach położonych głębiej (biodostępność). Pewną pomocą mogą służyć badania radiograficzne oraz chemiczne leczonej tkanki, co pozwala zebrać informację na temat rozmieszczenia leku.

Piśmiennictwo

1. *Borgers M.*: Ultrastructural correlates of antifungal therapy, [w:] Mc Ginnis M. R. (wyd.): Current Topics in Medical Mycology. T. 2. Springer-Verlag, New York 1988, 1, 18-23.
2. *Borgers M., Xhonneux B., Van Cutsem J.*: Oral itraconazole versus topical bifonazole treatment in experimental dermatophytosis. *Mycoses* 1993, 36, 105-109.
3. *Como I. A., Dismulees W. E.*: Oral azole as systemic antifungal therapy. *N. Eng. J. Med.* 1994, 263, 330-336.
4. *Degreef H.*: The treatment of superficial skin infections caused by dermatophytes, [w:] Borgers M., Hay R., Rinaldi M. G. (wyd.): Current Topics in Medical Mycology. T. 4. Springer-Verlag, New York 1992, s. 189.
5. *Georgopapadakou N. H., Walsh T. I.*: Humans mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* 1994, 264, 371-376.
6. *Gupta A. K., Nolting S., de Prost Y., Deleschuse J., Degreef H., Theissen U., Wallace R., Marynissen G., De Doncker P.*: The use of itraconazole to treat cutaneous fungal infections in children. *Dermatology* 1999, 199, 248-252.
7. *Gupta A. K., Sauder D. N., Shear N. H.*: Antifungal agents: an overview. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994, 30, 677-682.
8. *Jansen T., Van de Ven M., Borgers M., Odds F., Van Cutsem J.*: Fungal morphology after treatment with itraconazole as a single oral dose in experimental vaginal candidosis in rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991, 165, 1552-1557.
9. *Katz H. J.*: Interakcje leków w dermatologii. *Mat. Symp. Satelit. XIX Świat. Kongresu Dermatologicznego, Hamilton, Islandia 1977*, s. 94.
10. *Moran Maese D., Tarango-Martinez V. M., Gonzalez Trevino L. A., Mayorga J.*: Tinea capitis in an adult. Case report. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005, 22, 54-56.
11. *Nagino K., Shimohira H., Ogawa M., Uchida K., Yamaguchi H.*: Comparison of the therapeutic efficacy of oral doses of fluconazole and itraconazole in a guinea pig model of dermatophytosis. *J. Inf. Chem.* 2000, 6, 41-44.
12. *Okuda C., Ito M., Sato Y.*: Fungus invasion into human hair tissue in black dot ringworm: light and electron microscopic study. *J. Invest. Dermatol.* 1988, 90, 729-736.
13. *Pierard G. E., Awese J. E., De Doncher P.*: Antifungal activity of itraconazole and terbinafine in human stratum corneum: a comparative study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995, 32, 429-436.
14. *Plempel M., Regel E., Büchel K. H.*: Antimycotic efficacy of bifonazole in vitro and in vivo. *Drug Res.* 1983, 33, 517-523.
15. *Rashid A., Edward M., Richardson M. D.*: Aktywność terbinafiny wobec Trichophyton mentagrophytes badana na żywym modelu skóry człowieka. *Mikol. Lek.* 1996, 3 (1), 59-60.
16. *Van Cutsem J.*: Oral and parenteral treatment with itraconazole in various superficial and systemic experimental fungal infections. Comparisons with other antifungals and combination therapy. *Br. J. Clin. Pract.* 1990, 44 (Suppl. 71), 32-39.
17. *Van Cutsem J., Van Gerven F., Jansen P. A. J.*: Activity of orally, topically and parenterally administered itraconazole in the treatment of superficial and deep mycoses. *Animals models. Rev. Infect. Dis.* 1987, 9 (Suppl. 1), 15-22.
18. *Yamaguchi H., Uchida K.*: In vivo activity of bifonazole in quinea pigs: its characteristic features and comparison with clotrimazole. *Dermatologica* 1984, 169 (Suppl. 1), 33-40.

Adres autora: dr Jacek Piórkowski, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin;
e-mail: jacpol@hortus.ar.lublin.pl