

بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات دارویی آمفوتریسین B بر پایه تری متیل کیتوزان علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس

• لیلا نعمتی شیزری

گروه پاتوبیولوژی، قارچ شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران، ایران

• منصور بیات (نویسنده مسئول)

گروه پاتوبیولوژی، قارچ شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران، ایران

• ناصر محمدپور دونیقی

بخش جانوران سمی و تولید پادزهر موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

• نادر مصوری

بخش تولید توبرکولین و مالین موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران



تاریخ دریافت: ۲۸-۰۸-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۱۸-۱۱-۱۳۹۹

Email: dr_mansour_bayat@yahoo.com

چکیده

امروزه پیشرفت‌های اخیر در سیستم تحویل دارویی منجر به رفع معایب دارورسانی قدیم و افزایش چشمگیر تحویل دارو به بافت هدف شده و به همراه آن دوز درمانی، سمیت و عوارض جانبی کاهش یافته است. هدف از این مطالعه ارزیابی حساسیت ضد قارچی آمفوتریسین B بارگزاری شده در نانوذرات تری متیل کیتوزان و تری پلی فسفات سدیم در مقایسه با شکل سنتی دارو است. مطالعه بر روی ایزوله‌های مقاوم و حساس کاندیدا آلبیکنس با روش میکروداپلوشن براث مطابق پروتکل CLSA-A3 و همچنین بررسی متابولیسی تکثیر سلولی صورت گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که حداقل غلظت مهار (MIC90) نانوذرات آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو ۰/۲۵ و ۰/۷۵ و حداقل غلظت کشندگی (MFC) ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ایزوله‌های حساس می‌باشد. MIC90 برای ایزوله مقاوم نیز به ترتیب ۸ و ۳۲ و MFC به ترتیب ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود ($p < 0/05$)، ($p < 0/001$). همچنین نانوذرات و شکل سنتی دارو با آزمون مسیر متابولیسی در ایزوله حساس به ترتیب میزان ۹۰ و ۷۲ درصد و در ایزوله مقاوم ۷۳ و ۵۱ درصد منجر به مهار رشد قارچ در مقایسه با شاهد شدند. نتایج این تحقیق بیان می‌کند نانوذرات آمفوتریسین B به‌عنوان یک ضد قارچ مؤثر، پتانسیل بسیار بالاتری نسبت به شکل سنتی داشته و همچنین در نتیجه آهسته رهش شدن، منجر به تحویل مداوم آنتی‌بیوتیک هنگام درمان می‌شود.

کلمات کلیدی: آمفوتریسین B، نانوذرات، کاندیدا آلبیکنس، میکروداپلوشن براث، تری متیل کیتوزان

● Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 123-130

Antifungal activity of Amphotericin B-Loaded N, N, N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles against *Candida albicans*

By: Nemati shizari, L., Department pathobiology faculty of veterinary specialized science. science and research branch. islamic azad university, tehran, iran. Bayat, M., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Specialized Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Mohamad-pour Dounighi, N., Department of Human Vaccine and Serum, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. and Mosavari, N., Department of Tuberculosis, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received: 2020-11-18 Accepted: 2021-02-06

Email: dr_mansour_bayat@yahoo.com

Recent advancements in drug delivery system through development of nanomedicine has significantly improved the delivery of the medicine to the target tissue, consequently reduced the required therapeutic dose, toxicity and side effects. The aim of this study was test antifungal susceptibility of trimethylchitosan nanoparticles in combination with amphotericin B (NPs-AmB) through broth micro-dilution method described in CLSA-A3 guidelines on resistant (R) and susceptible (S) *Candida albicans* isolates and the cell viability and proliferation assays. Minimum inhibitory concentrations (MICs) 90 % of NPs-AmB and AmB determined to be 0.25 and 0.75 $\mu\text{g/mL}$, and minimum fungicidal concentration (MFC) were 0.5 and 1 $\mu\text{g/mL}$ for S-isolate. MIC 90 for R-isolate were 8 and 32 $\mu\text{g/mL}$ and MFC were 32 and 64 $\mu\text{g/mL}$ respectively demonstrating a significant improvement in antifungal activity ($p < 0.05$, $p < 0.001$). The growth inhibition rate of NPs-AmB and AmB on S-isolates compared to control was 90 and 72 %, and on R-isolate was 73 and 51 % respectively. After 24h, NPs-AmB continued growth inhibition while increase in fungal growth was observed in the test by AmB by control comparison, indicating slow release of NPs-AmB compared to the conventional antifungal compounds. This results indicated that the method used in this study has significantly improved the antifungal activity, and has prolonged the drug release duration in NPs-AmB compared to the traditional AmB.

Key words: Amphotericin B, Nanoparticles, *Candida albicans*, Microdilution Broth, Trimethyl chitosan

مقدمه

آمفوتریسین B، از آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی بوده که از طریق پیوند به استرول‌های غشایی و افزایش نفوذپذیری آن، منجر به خروج یون‌های تک‌ظرفیتی، تخریب غشا و مهار رشد قارچ می‌شود (۲، ۲۱). این آنتی‌بیوتیک بر روی بسیاری از گروه‌های قارچی مؤثر بوده و با توجه به گستردگی طیف اثر آن اصطلاح چاقوی ارتش سوئیس (Swiss Army Knife) که کنایه از یک وسیله پرکاربرد با استفاده‌های چندجانبه است به آن تعلق گرفته است و مقاومت‌های دارویی نیز به ندرت نسبت به این دارو مشاهده شده است (۲۳). با این وجود، به دلیل تمایلی که گیرنده‌های آن به سلول‌های یوکاریوتی دارند، پس از مصرف ایجاد عوارض جانبی متعدد (نارسایی کلیوی، کم‌خونی، کاهش پتاسیم خون، تب و لرز، تهوع و استفراغ) را می‌نماید که منجر به محدودیت استفاده از این داروی پرکاربرد شده است (۲، ۱۸). لذا در حال حاضر فقط به شکل تزریقی برای درمان عفونت‌های سیستمیک و تهاجمی قارچی در شرایط خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵). مجموع این شرایط آمفوتریسین B را گزینه

مناسبی برای اصلاح ساختار با استفاده از نانو بیوتکنولوژی می‌نماید تا بتوان از پتانسیل واقعی آن بهره مناسبی برد.

امروزه علم بیوتکنولوژی به رویکردهای جدیدی در تهیه نانو فرمولاسیون برای رفع معایب دارورسانی سنتی پرداخته است. سیستم‌های تحویل دارو (Drug Delivery System) عملکرد قابل توجهی را در افزایش خصوصیات زیستی و درمانی، کاهش عوارض جانبی، ظرفیت بالا برای حمل دارو را ایجاد کرده و به دلیل ایجاد سطح فعال بسیار وسیع برای واکنش، مصرف دوز دارویی را کمتر و منجر به تجمع دارو را منحصر در بافت هدف می‌شوند (۳، ۹).

در مطالعه قبلی (۱۵) به فرمولاسیون جدیدی از نانو ذرات دارویی تهیه شده آمفوتریسین B بر پایه تری متیل کیتوزان و تری پلی فسفات سدیم دست یافته و پس از بررسی پارامترهای مؤثر (خصوصیات فیزیکی از جمله سایز نانو ذرات، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی با استفاده از زتا سایز و میکروسکوپ الکترونی)، میزان توانمندی دارو پروفایل رها سازی دارو را تعیین کردیم. همچنین میزان کاهش سمیت و عوارض جانبی دارو

فرمولاسیون و سنتی (۱، ۱۳، ۲۰)، در داخل میکرو پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل، رقت‌های داروی آموتریسین B (Sigma, USA)، برای ایزوله حساس در محدوده ۰/۰۱۵ الی ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانو ذرات و شکل سنتی دارو به صورت رقت‌های دو برابر با حجمی معادل ۱۰۰ در هر چاهک در NaDC (Sigma, USA) پنج درصد در آب مقطر به عنوان حلال دارو تهیه شد. محیط (Merck, Germany) RPMI به همراه ال-گلوتامین (Sigma, USA) تهیه و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون استریل گردید. (pH = ۶/۹) سپس به هر چاهک میزان ۵۰ میکرولیتر محیط افزوده شد.

پس از کشت ایزوله‌های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکس در محیط سابورو دکستروز آگار (SDA, Merck, Germany) و تهیه سوسپانسیون قارچ با تعداد 0.5×10^3 تا 1×10^3 سلول در هر ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با استفاده از لام نئوبار تهیه و به هریک از چاهک‌های حاوی محیط کشت و رقت‌های دارویی اضافه شد. محدوده رقت‌های دارویی برای ایزوله مقاوم نیز برابر با ۰/۱۲ الی ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. لازم به ذکر است که هریک از رقت‌های دارویی در مورد هر یک از ایزوله‌ها به صورت سه‌تایی مورد بررسی قرار گرفتند. چاهک بدون دارو به عنوان شاهد و چاهک حاوی بالاترین غلظت دارو فاقد سوسپانسیون قارچ به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

در نهایت میکروپلیت‌ها در شیکر انکوباتور (GLF, Germany) با دور ۱۳۵ در دقیقه در دمای ۳۵ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت از هر چاهک به میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط برین هارت آگار (BHI, Merck, Germany) حاوی کلرامفنیکل (Fluka, England) تلقیح گردید و با مقداری سرم فیزیولوژی استریل در سطح محیط مذکور یکنواخت گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ سانتی‌گراد در انکوباتور (GLF, Germany) نگهداری شد و بر اساس شمارش تعداد کلنی‌های قارچی و مقایسه آن با گروه کنترل میزان غلظت مهارکنندگی (MIC) و میزان فعالیت کشندگی (MFC) هر کدام از ایزوله‌ها محاسبه گردید.

طبق پروتکل CLSI-A3 در روش رقیق سازی در مایع، ایزوله‌هایی که در غلظت کمتر یا مساوی با یک میکروگرم در میلی‌لیتر از آموتریسین B مهار می‌شوند، جزء ایزوله‌های حساس دسته بندی می‌شوند و آن‌هایی که مهار رشدشان در غلظت‌های مساوی و بالاتر از یک میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین می‌شود، جزء ایزوله‌های مقاوم به داروی طبقه بندی می‌شوند.

ایزوله‌های قارچ کاندیدا آلبیکس در مطالعه

ایزوله استاندارد کاندیدا آلبیکس با کد ATCC 10231 حساس به آموتریسین B و ایزوله کاندیدا آلبیکس مقاوم به آموتریسین B جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در بیمارستان شهر اهواز.

میزان تأثیر مهار رشد دارو با استفاده از روش Cell Viability and Proliferation Assays

یک روش نیمه کیفی در سنجش مهار رشد بر اساس متابولیسم سلولی است که با استفاده از XTT با فرمول (

را بر روی سلول‌های زنده را تعیین کرده‌ایم.

در این مطالعه به بررسی و ارزیابی تأثیر ضد قارچی نانو ذرات دارویی تهیه شده در برابر شکل سنتی دارو بر روی قارچ کاندیدا آلبیکس مطابق پروتکل‌های CLSI-A3 (۱۴) پرداخته شده است. این قارچ با ماهیت فلور نرمال خود، شایع‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های فرصت طلب قارچی با فراوانی ۵۰ الی ۷۵٪ بوده و توانایی ایجاد عفونت‌های کلینیکال متعددی را در انسان و حیوان دارد (۵، ۶). با وجود حساسیت بالای قارچ کاندیدا آلبیکس به آموتریسین B، محدودیت‌هایی چون عدم جذب به اشکال موضعی و گوارشی و همچنین عوارض جانبی شدید، مانع بهره‌گیری از این داروی قدرتمند در صورت مختلف عفونت‌های کاندیدیازیس می‌باشند. به‌طور مثال در عفونت‌های واژینوز کاندیدیاز، درمان با داروهای آزولی منجر به مقاومت‌های شدید دارویی و در نهایت عود مکرر این بیماری شده است (۸) اخیراً مطالعات زیادی در راستای استفاده از فرمولاسیون‌های مبتنی بر نانوذرات پلیمری با استفاده از کیتوزان و مشتقات آن برای بهبود دارورسانی و کاهش عوارض جانبی در داروهای ضد قارچی صورت پذیرفته است. مطالعات نشان می‌دهد آموتریسین B پس از اصلاح ساختاری با استفاده از نانوبیوتکنولوژی، قابلیت استفاده در اشکال غیرتزریقی مانند گوارش و موضعی را داشته است. این موضوع در بحث درمانی می‌تواند منجر به جلوگیری از انتشار عفونت‌های قارچی شود و خطر تهاجم عمیق بافتی را کاهش دهد. همچنین مخاطرات جدی مانند عفونت‌های شدید و احشایی و به دنبال آن مرگ و میر را کنترل می‌کند (۳، ۹، ۱۲).

روش کار

روش مطالعه از نوع مداخله‌ای و به شیوه کار آزمایشی بالینی می‌باشد.

تهیه نانوذرات دارویی آموتریسین B

مطابق با فرمولاسیون محاسبه شده در مطالعه قبلی، پس از سنتز تری متیل کیتوزان با متیلاسیون ۳۶٪ با استفاده از کیتوزان (Primax, Ireland)، محلولی با غلظت ۰/۷۵ گرم در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. سپس محلول تری پلی فسفات سدیم (عامل اتصالات عرضی) با غلظت ۰/۵ گرم در میلی‌لیتر در ترکیب با محلول دارویی (غلظت ۰/۰۰۵ گرم در صد میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر به همراه ۵ درصد NaDC و ۰/۰۶ درصد DMSO) با نسبت ۳:۱ تهیه شد و به صورت قطره‌ای بر روی استیرر با دور ۱۲۰۰ rpm به محلول تری متیل کیتوزان با نسبت ۴ : ۱۰ میلی‌لیتر افزوده شد. در این حالت با ایجاد پیوندهای الکترواستاتیک و واندروالسی تحت تأثیر استرس ناشی از هموژنیزاسیون، نانوذرات دارویی بارگیری شدند. مطابق فرمولاسیون تعیین شده در مطالعه‌ای قبلاً انجام دادیم، در نسبت‌های ذکر شده شاخص پراکندگی، سایز و پتانسیل زتا در نانو ذرات دارویی به ترتیب معادل ۰/۴، 15 ± 365 نانومتر و 28 ± 0.5 میلی‌ولت می‌باشد.

تعیین میزان حساسیت قارچ نسبت به نانو ذرات آموتریسین B و شکل سنتی دارو به روش میکرودیالوژن برات طبق پروتکل

(۱) CLSI A3 (Clinical Laboratory Standards Institute M27-A3) بر طبق روش استاندارد مطابق با پروتکل ارزیابی داروها در اشکال نانو

2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide انجام می‌شود. (۲۰)

تعداد ۱۰۶ سلول در هر میلی‌لیتر از هر دو ایزوله حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکس در محیط کشت ٹیست دکستروز آگار (YDB, Sigma, USA) پس از کشت ایزوله‌های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکس در محیط SDA و شمارش با لام نئوبار تهیه شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. از نانو ذرات آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو در غلظت یک (mg/mL)، میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده شد و پس از گذشت زمان‌های دو، چهار، شش، هشت و ۲۴ ساعت، محلول XTT (Merck, Germany) به صورت (g/mL) ۰/۰۰۵ در بافر فسفات تهیه و پس از خارج کردن ۵۰ میکرولیتر از هر چاهک و افزودن ۳۰ میکرولیتر محیط تازه YDB و ۲۰ میکرولیتر محلول XTT میکروپلیت را در ورق آلومینیومی پیچیده و ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۴ ساعت محتویات چاهک‌ها تخلیه شده و به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر از دی متیل سولفواکساید (DMSO, Merck, Germany) اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۱۰ دقیقه روی استیر (Ependorff, Germany) قرار گرفت و با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Bioscreen, USA) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری آن قرائت شد. چاهک بدون دارو به عنوان شاهد و چاهک فاقد سوسپانسیون قارچ به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

سنجش آماری

تجزیه و تحلیل آماری توسط ANOVA دو طرفه انجام شد.

نتایج

نتایج مربوط به آزمایش تعیین حساسیت کاندیدا آلبیکس نسبت به نانو ذرات دارویی آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف از نانو ذرات دارویی آمفوتریسین B و شکل سنتی آن در غلظت‌های ۰/۰۱-۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی رشد ایزوله‌های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکس نشان داد که نانو ذرات دارویی تأثیر ضد قارچی بیشتری با اختلاف آماری نسبت به شکل سنتی دارو در مهار رشد قارچ داشته است. (جدول ۱).

نتایج حاصله با استفاده از آنالیز ANOVA دو طرفه مورد بررسی قرار گرفت و میزان اختلاف آماری در هر غلظت در دو ایزوله حساس و مقاوم نسبت به نانو ذرات دارویی و شکل سنتی در شکل ۱ و ۲ به تفکیک مشخص شده است.

در این آزمایش تفاوت میزان MIC و MFC و مقایسه آن‌ها مد نظر قرار گرفت و نتایج نشان داد که نانو ذرات دارویی در غلظت‌های پایین‌تری نسبت به شکل سنتی دارو قادر به مهار رشد قارچ بوده است. ۹۰ MIC برای نانو ذرات دارویی آمفوتریسین B و شکل سنتی آن بر روی ایزوله حساس کاندیدا آلبیکس به ترتیب در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و بر روی ایزوله مقاوم به ترتیب برابر هشت و ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید.

میزان MFC برای نانو ذرات دارویی آمفوتریسین B و شکل سنتی آن بر روی ایزوله حساس کاندیدا آلبیکس به ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و یک

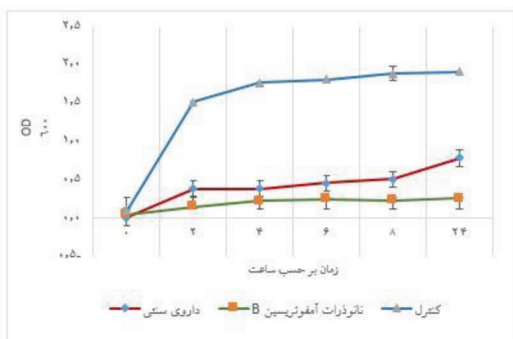
جدول ۱- میانگین درصد رشد ایزوله حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکس در مواجهه با نانوذرات آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو در سه مرحله تکرار.

غلظت (g/mL)										میانگین درصد رشد در مواجهه با نانو ذرات آمفوتریسین B
۸	۴	۲	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱۵	
۰	۰/۶	۰/۶	۰	۰/۳	۸/۶	۲۰/۳	۴۹/۶	۷۰/۶	۹۳/۳	میزان انحراف از استاندارد
۰	۱/۱۵	۰/۵۷	۰	۰/۵۷	۰/۵۷	۱/۵۲	۷/۰۲	۱۰/۰۶	۳/۲۱	میانگین درصد رشد در مواجهه با داروی سنتی
۰/۳	۰	۰/۳	۱/۳	۱۹/۶	۵۰/۶	۶۰/۶	۶۷/۳	۷۵/۶	۹۲	میزان انحراف از استاندارد
۰/۵۷	۰	۰/۵۷	۰/۵۷	۱/۵۲	۳/۷۸	۵/۸۵	۵/۰۳	۴/۰۴	۲/۶۴	میزان اختلاف آماری
P>۰/۰۵	P>۰/۰۵	P>۰/۰۵	P>۰/۰۵	P<۰/۰۰۵	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۵	P>۰/۰۰۵	P>۰/۰۰۵	
غلظت (µg/mL)										میانگین درصد رشد در مواجهه با نانو ذرات آمفوتریسین B
۶۴	۳۲	۱۶	۸	۴	۲	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۱۵	
۰/۳	۱	۶/۳	۱۱/۳	۳۳/۶	۵۶/۳	۶۸	۹۸	۹۸/۳	۹۹	میزان انحراف از استاندارد
۰/۵۷	۱	۳/۰۵	۳/۵۱	۴/۷۲	۵/۶۸	۹/۸۴	۱	۱/۵۲	۱	میانگین درصد رشد در مواجهه با داروی سنتی
۱	۱۳	۶۱/۶	۹۳/۳	۹۸/۳	۹۶/۳	۹۹/۶	۱۰۰/۳	۱۰۰	۱۰۰/۶	میزان انحراف از استاندارد
۱	۴/۳۵	۳/۷۸	۳/۷۸	۳/۷۸	۴/۷۲	۰/۵۷	۲/۵۱	۱	۲/۰۸	میزان اختلاف آماری
P>۰/۰۰۵	P>۰/۰۰۵	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P>۰/۰۰۵	P>۰/۰۰۵	P>۰/۰۰۵	

شکل سنتی آن در مقایسه با کنترل بر روی ایزوله‌های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکس با استفاده از روش سنجش XTT و اندازه‌گیری فعالیت متابولیک مطابق شکل ۳ و ۴ در طول موج تعیین شده نشان داده شده است. بین نتایج حاصله از قرائت طول موج‌های مربوط به کنترل، اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) با ایزوله تحت تأثیر هر دو دارو وجود دارد. نانو ذرات دارویی به‌طور میانگین میزان ۹۰ درصد رشد ایزوله حساس کاندیدا آلبیکس در مقایسه با کنترل و داروی سنتی ۷۲ درصد مهار رشد داشت. این میزان برای ایزوله مقاوم قارچ به ترتیب برابر با ۷۳ درصد و ۵۱ درصد بود. اختلاف معنی‌دار در مهار رشد دو شکل دارو برای ایزوله حساس وجود ندارد و برای ایزوله مقاوم در زمان‌های دو و ۲۴ ساعت مشاهده شد. ($P < 0.05$).

بحث

امروزه تحقیقات در زمینه تولید حاملین داروهای مانند آمفوتریسین B که وسیع‌الطیف ولی با عوارض جانبی بالا هستند رو به گسترش بوده تا با افزایش اثر ضد قارچی، عوارض جانبی آن را به حداقل برسانند (۱۸). در مطالعات مختلف انجام شده، آمفوتریسین B یکی از قدیمی‌ترین

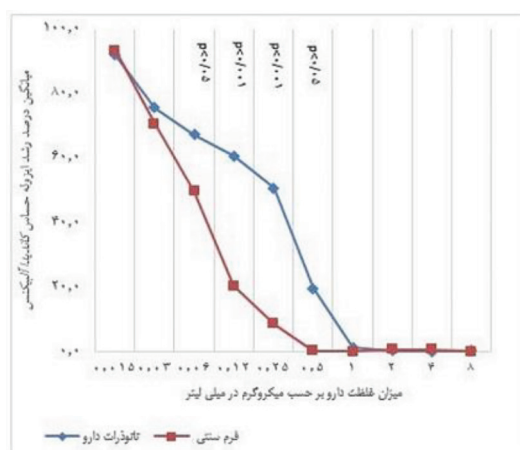


شکل ۱- مقایسه میزان مهار رشد ایزوله حساس کاندیدا آلبیکس در مواجهه با نانو ذرات دارویی آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو با روش حساسیت سنجی CLSI-A۳.

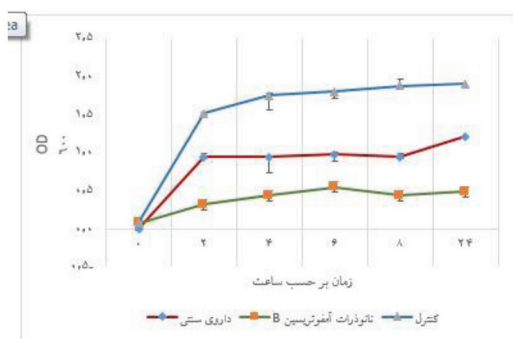
میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد و بر روی ایزوله مقاوم به ترتیب برابر ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید. در چاهک‌های مربوط به کنترل که دارو در آن‌ها استفاده نشده بود میزان رشد قارچ برابر یا میزان تلقیح اولیه و در چاهک‌های مربوط به شاهد که در آن‌ها از دارو استفاده شده و قارچ تلقیح نگردیده بود، هیچ گونه رشدی مشاهده نشد.

نتایج مقایسه تأثیر مهار رشد دارو با استفاده از روش Cell Viability and Proliferation Assays

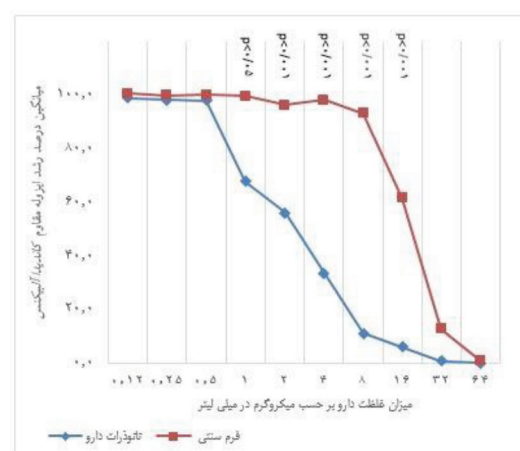
کاهش متناسب فعالیت متابولیکی تأثیر نانو ذرات آمفوتریسین B و



شکل ۲: مقایسه میزان مهار رشد ایزوله مقاوم کاندیدا آلبیکس در مواجهه با نانو ذرات دارویی آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو با روش حساسیت سنجی CLSI-A۳.



شکل ۳- کاهش متناسب فعالیت متابولیکی ایزوله حساس کاندیدا آلبیکس تحت تأثیر نانو ذرات آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو.



شکل ۴- کاهش متناسب فعالیت متابولیکی ایزوله مقاوم کاندیدا آلبیکس تحت تأثیر نانو ذرات دارویی آمفوتریسین B و شکل سنتی دارو با روش حساسیت سنجی CLSI-A۳.

قارچی در شکل سنتی دارو ضعیف تر می شود. در صورتی که در خصوص نانو ذرات دارویی، مهار رشد قارچ ثابت بوده و آهسته رهش بودن دارو در غالب نانو ذرات دارویی تأیید می شود. طبق نتایج حاصله اختلاف اثرات مهارتی در ایزوله مقاوم مشهودتر است و آن نشان دهنده تأثیر محسوس استفاده از تکنولوژی نانو در مقابله با مقاومت های دارویی است که نتایج با مطالعات انجام شده توسط Xu و همکاران مطابقت دارد (۲۴). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Sanchez و همکاران انجام شد نیز نتایج مشابهی وجود دارد. در این مطالعه، پس از ۴ ساعت ۹۵/۹ درصد مهار رشد ایزوله های حساس قارچ کاندیدا مشاهده شده و اختلاف آماری بین تأثیر نانو ذرات آمفوتریسین B و شکل سنتی بر روی ایزوله حساس مشاهده نمی شود (۲۰).

ترکیبات استفاده شده در تهیه نانوذرات دارویی بسیار حائز اهمیت بوده و علاوه بر ایجاد فرمولاسیون بر پایه نانو، می تواند در تشدید فعالیت دارو تأثیر گذار باشد. در مطالعه ای که توسط Yien و همکاران صورت گرفت تری متیل کیتوزان به تنهایی با غلظت (mg/mL) ۰/۲ دارای اثر قارچ کشی بر روی کاندیدا آلبیکس بوده است (۲۵). همچنین در مطالعه ای که توسط Palmeira و همکاران انجام شد، مطرح شده است که تری پلی فسفات به تنهایی از خاصیت قارچ کشی برخوردار می باشد و استفاده از آن به عنوان عامل اتصالات عرضی در ترکیب نانوفرمولاسیون در مطالعه حاضر اثر ضد قارچی آمفوتریسین B را علاوه بر قرار دادن آن در موقعیت نانو ذرات دارویی، تقویت کند (۱۹). لذا ترکیبات بکار گرفته با فرمولاسیون تعیین شده نقش بسزایی در افزایش اثرات ضد قارچی در نانوذرات دارویی این مطالعه داشته و می تواند به عنوان حامل برای آنتی بیوتیک های قارچی نیز در سایر تحقیقات مورد استفاده قرار گیرد. در نهایت، مطالعه انجام شده نشان داد که نانو داروی تهیه شده، می تواند به عنوان فرمولاسیونی مناسب در تهیه داروی آمفوتریسین B برای درمان بیماران قارچی مورد استفاده قرار گیرد، زیرا تعادلی مناسب بین سمیت و کارایی ضد قارچی آن وجود داشته و پتانسیل داروی آمفوتریسین B را افزایش داده است. در این تحقیق، اثرات ضد قارچی نانوذرات دارویی در شرایط برون تن بر روی قارچ کاندیدا آلبیکس نشان از کارایی بالای آن در مقایسه با شکل سنتی دارو داشت، زیرا دوز کمتر از نانوذرات آمفوتریسین B رشد قارچ مذکور را در مقایسه با شکل سنتی دارو متوقف نمود. استفاده از نانوتکنولوژی در اصلاح معایب سیستم سنتی دارویی می تواند منجر به افزایش پایداری فرمولاسیون دارو، بهای کمتر، کاهش دوز مصرفی و دفعات مصرف، سمیت کمتر و کاهش عوارض جانبی شود. همچنین شرایطی چون قابلیت تجمع و ایجاد غلظت بالایی از دارو در بافت هدف ایجاد کرده و با فراهم کردن محدوده درمانی مطلوب به مدت کوتاه در برابر شکل سنتی (دارورسانی غیرهدفمند و حذف سریع دارو از جریان خون، آزادسازی کنترل نشده و افزایش مصرف دوز درمانی، تخریب بافت ها و سلول های سالم، نوسان غلظت دارو) در راستای بهداشت و سلامت جامعه نقش مؤثری دارد.

نتیجه گیری کلی

یافته های این مطالعه نشان داد که آمفوتریسین B بارگذاری شده در تری متیل کیتوزان می تواند به صورت مؤثر و معنی داری رشد ایزوله های

داروهای ضد قارچی می باشد که اثر مهارکنندگی و کشندگی آن بر روی قارچ های زیادی از جمله گونه های اسپرزیلوس، کاندیدا و موکور به اثبات رسیده است. ولی به دلیل محدودیت هایی چون عوارض جانبی و عدم جذب در اشکال مختلف، قابل استفاده نبوده و در پروفیلاکسی نیز استفاده نمی شود (۴، ۱۱). با توجه به تغییر طیف میکروبیولوژیکی قارچ ها از حالت فرصت طلب و تبدیل آن ها به شکل تهاجمی به همراه افزایش دیگر شرایط مساعدکننده، درمان عفونت های قارچی به یکی از مشکلات در حال گسترش بیمارستان ها و مراکز درمانی شده است (۲).

این مطالعه با هدف افزایش اثر ضد قارچی آمفوتریسین B با استفاده از راه کار نانو ذرات دارویی صورت گرفته و نتایج حاصل از مطالعات قبلی ما را که مبنی بر بهبود ویژگی های دارویی آمفوتریسین B در نانوفرمولاسیون جدید است، تأیید می کند. این نتیجه منطبق بر مشاهده Zia و همکارانش نیز می باشد که گزارش نمودند نوعی نانوذرات حامل آمفوتریسین B به نام Amb-NAs در مقایسه با شکل سنتی دارو سمیت بسیار کمتری بر روی قارچ کاندیدا دارد (۲۶). وجود الگوی حساسیتی قابل تعیین برای قارچ کاندیدا آلبیکس و بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات تهیه شده در شرایط برون تن در این مطالعه نشان داد که فرمولاسیون حاضر توانمندی دارویی مذکور را با دوز کمتر افزایش داده است. طبق نتایج منطبق بر شکل ۱ بیشترین اختلاف در مهار رشد قارچ در ایزوله حساس بین نانو ذرات دارویی و شکل سنتی در غلظت ۰/۲۵ ($P < 0/001$) و در ایزوله مقاوم در غلظت هشت میلی گرم در میلی لیتر ($P < 0/001$) مشاهده شده است. این نتایج نشان دهنده مطلوب بودن اثر نانو ذرات دارویی تهیه شده و اختلاف آشکار بین نتایج در مهار و سرکوب رشد قارچ می باشد. این امر، طبق نتایج به دست آمده از سایر تحقیقات، می تواند ناشی از عواملی مانند افزایش غلظت آمفوتریسین B در اطراف سلول های هدف و ورود آن به سلول ها باشد که هر دو مورد ذکر شده از محصور شدن دارو در لایه پلیمری منشأ گرفته است (۷، ۱۷). در مطالعه ای که توسط Lotfali و همکاران انجام شده است، ارزیابی نانوذرات دارویی نقره و سلنیم در ترکیب با آمفوتریسین B در برابر شکل سنتی دارو با استفاده از روش Sf-27 Clsi M بر روی قارچ کاندیدا انجام شده است. طبق نتایج حاصله رشد قارچ در برابر نانوفرمولاسیون دارویی کاهش محسوسی نسبت به شکل سنتی داشته است (۱۳). این یافته در مطالعه Moghimi و Halbandge نیز اثبات گردیده است، به طوری که طی تحقیقات انجام گرفته توسط محققان مذکور، میزان اثر بخشی (کاهش مقدار MIC) نانو ذرات تهیه شده حاوی آمفوتریسین B به ترتیب ۲۵ و ۴۵ درصد کاهش یافته است (۱۰، ۱۶).

کاهش MIC نانوکپسول های تهیه شده در مقایسه با آمفوتریسین B به شکل سنتی همان طور که Takemoto گزارش نموده است، می تواند گویای این باشد که نانوکپسول های تهیه شده به علت سمیت کمتر نسبت به شکل سنتی دارو، می تواند به عنوان گزینه ای مناسب جهت درمان عفونت های قارچی ناشی از کاندیدا آلبیکس استفاده گردد (۲۲). بررسی آزمایش Cell Viability and Proliferation Assays نشان داد که برای تأیید اثر ضد قارچی نانو ذرات آمفوتریسین B به مدت ۲۴ ساعت، به نظر می رسد که پس از چهار ساعت میزان تأثیر دارو به شکل یکتواخت می باشد. ولی پس از ۲۴ ساعت طبق شکل ۳ و ۴ مهار رشد ایزوله های

Shaaban. 2019. Types of yeasts that cause vulvovaginal candidiasis in chronic users of corticosteroids. *Medical Mycology* 57: 681-687.

9 - Farooqi, A. A., N. N. Desai, M. Z. Qureshi, D. R. N. Librelotto, M. L. Gasparri, A. Bishayee, S. M. Nabavi, V. Curti and M. J. B. a. Daglia. 2018. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnology Advances* 36: 328-334.

10- Halbandge, S. D., S. P. Mortale and S. M. J. T. O. N. J. Karuppaiyil. 2017. Biofabricated silver nanoparticles synergistically activate amphotericin B against mature biofilm forms of *Candida albicans*. *The Open Nanomedicine Journal* 4: 1-16.

11- Hamill, R. J. 2013. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs* 73: 919-934.

12- Lanza, J. S., S. Pomel, P. M. Loiseau and F. J. E. o. d. d. Frézard. 2019. Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniases. *Expert Opinion on Drug Delivery* 16: 1063-1079.

13- Lotfali, E., A. R. Shahverdi, R. Mohammadi, F. Noorbakhsh, A. Ghajari, S. Ansari and S. J. A. o. C. I. D. Rezaie. 2017. In Vitro Activity of Two Nanoparticles on Clinical Isolates of *Candida parapsilosis*, Showing Resistance Against Antifungal Agents in Children. *Archives of clinical infectious DIS* 12: e13853.

14 - Lovero, G., O. De Giglio, S. Rutigliano, G. Diella, G. Caggiano and M. T. J. J. o. m. m. Montagna. 2017. In vitro antifungal susceptibilities of *Candida* species to liposomal amphotericin B, determined using CLSI broth microdilution, and amphotericin B deoxycholate, measured using the Etest. *J Med Microbiol* 66: 213-216.

15- Marena, G. D., M. A. d. S. Ramos, T. M. Bauab and M. J. C. R. i. A. C. Chorilli. 2020. A critical review of analytical methods for quantification of amphotericin B in biological samples and pharmaceutical formulations. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 21: 1-22.

16- Moghimi, R., A. Aliahmadi and H. J. U. s. Rafati. 2017. Ultrasonic nanoemulsification of food grade trans-cinnamaldehyde: 1, 8-Cineol and investigation of the mechanism of antibacterial activity. *Ultrasonics Sonochemistry* 35: 415-421.

17- Morris, A. J., K. Rogers, W. P. McKinney, S. A. Roberts and J. T. Freeman. 2018. Antifungal susceptibility testing results of New Zealand yeast isolates, 2001–2015: Impact of recent CLSI break-points and epidemiological cut-off values for *Candida* and other yeast species. *Journal of global antimicrobial resistance* 14: 72-77.

18- Nemati Shizari, L., N. Mohammadpour Dounighi, M. Bayat and N. Mosavari. 2020. A New Amphotericin B-loaded Trimethyl Chitosan Nanoparticles as a Drug Delivery System and Antifungal

حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس را مهار نماید؛ بنابراین می‌توان با استفاده از نانو بیوتکنولوژی در زمینه آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی به عنوان یک راهبرد جدید در درمان عفونت‌های قارچی بهره برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کارکنان مدیریت کنترل کیفی و بخش تولید سرم‌های درمانی در موسسه رازی که در مراحل مختلف پروژه همکاری نموده‌اند، کمال تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

1- Altinbaş, R., A. Bariş, S. Şen, R. Öztürk and N. J. T. J. o. M. S. Kırız. 2020. Comparison of the Sensititre YeastOne antifungal method with the CLSI M27-A3 reference method to determine the activity of antifungal agents against clinical isolates of *Candida spp.* 50: 2024-2031.

2- Bajpai, V. K., I. Khan, S. Shukla, P. Kumar, I. A. Rather, Y.-H. Park, Y. S. Huh, Y.-K. J. B. Han and B. Engineering. 2019. Invasive fungal infections and their epidemiology: measures in the clinical scenario. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 24: 436-444.

3- Beg, S., W. H. Almalki, A. Malik, M. Farhan, M. Aatif, K. S. Alharbi, N. K. Alruwaili, M. Alrobaian, M. Tarique and M. J. D. D. T. Rahman. 2020. 3D printing for drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today* 25: 1668-1681.

4 - Boswell, G., D. Buell and I. Bekersky. 1998. AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review. *The Journal of Clinical Pharmacology* 38: 583-592.

5- Canela, H. M. S., B. Cardoso, L. H. Vitali, H. C. Coelho, R. Martinez and M. E. d. S. J. M. Ferreira. 2018. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses* 61: 11-21.

6- Chávez-Fumagalli, M. A., T. G. Ribeiro, R. O. Castilho, S. O. A. Fernandes, V. N. Cardoso, C. S. P. Coelho, D. V. C. Mendonça, M. Soto, C. A. P. Tavares and A. A. G. Faraco. 2015. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48: 235-242.

7- Espinel-Ingroff, A., F. Barchiesi, M. Cuenca-Estrella, M. Pfaller, M. Rinaldi, J. Rodriguez-Tudela and P. Verweij. 2005. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Journal of clinical microbiology* 43: 3884-3889.

8 - Farhan, M. A., A. M. Moharram, T. Salah and O. M. J. M. m.

Activity on *Candida albicans* Biofilm. *Archives of Razi Institute* 76: 2021.

19- Palmeira-de-Oliveira, R., A. Palmeira-de-Oliveira, C. Gaspar, S. Silvestre, J. Martinez-de-Oliveira, M. Amaral and L. J. I. j. o. p. Breitenfeld. 2011. Sodium Tripolyphosphate: An excipient with intrinsic in vitro anti-*Candida* activity. *International Journal of Pharmaceutics* 421: 130-134.

20- Sanchez, D. A., D. Schairer, C. Tuckman-Vernon, J. Chouake, A. Kutner, J. Makdisi, J. M. Friedman, J. D. Nosanchuk and A. J. Friedman. 2014. Amphotericin B releasing nanoparticle topical treatment of *Candida* spp. in the setting of a burn wound. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 10: 269-277.

21- Silva-Carvalho, R., J. Fidalgo, K. Melo, M. Queiroz, S. Leal, H. Rocha, T. Cruz, P. Parpot, A. Tomás and M. Gama. 2020. Development of dextrin-amphotericin B formulations for the treatment of Leishmaniasis. *International Journal of Biological Macromolecules* 153: 276-288.

22- Takemoto, M. and J. K. Liao. 2001. Pleiotropic effects of 3-hy-

droxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arteriosclerosis, thrombosis,vascular biology* 21: 1712-1719.

23- Waelchli, R., M. Känzig, A. Gyga, L. Corboz and P. Rüschi. 1993. The relationship between cycle stage and results of uterine culture in the mare. *Journal of Veterinary Medicine Series* 40: 569-575.

24- Xu, J., B. Xu, D. Shou, X. Xia and Y. J. P. Hu. 2015. Preparation and evaluation of vancomycin-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles. *Polymers* 7: 1850-1870.

25- Yien, L., N. M. Zin, A. Sarwar and H. Katas. 2012. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International journal of Biomaterials* 2012: 1-9.

26- Zia, Q., O. Mohammad, M. A. Rauf, W. Khan and S. Zubair. 2017. Biomimetically engineered Amphotericin B nano-aggregates circumvent toxicity constraints and treat systemic fungal infection in experimental animals. *Scientific reports* 7: 1-19.

