Investigation of the antifungal effect of thymol-loaded nanoliponiosomes on *ERG11* gene expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates

Mohaddeseh Larypoor[1]*, Hoora Dadgoster[1], Mohammad Reza Razavi[2], Zahra Goodarz Ghaleh Mehdikhani[3]

1-Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2-Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3-Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, NT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Resistance of *Candida albicans* to fluconazole and the role of the *ERG11* gene in this phenomenon represent a significant challenge. This study focuses on natural antifungal compounds such as thymol and investigates the antifungal effect of thymol-loaded liponiosomes on *ERG11* gene expression.

Materials and Methods: Resistance to fluconazole and the presence of the *ERG11* gene were investigated using PCR in *Candida albicans* isolates isolated from clinical samples. Thymol was purchased and thymol-loaded liponiosomes were prepared using the thin layer and water method. The diffusion rate, appearance, chemical structure, size, dispersion index, and zeta potential of liponiosomes were investigated. Antibiogram tests were performed to evaluate the effect of Sub-Minimum Inhibitory Concentration on ERG11 gene expression in resistant isolates using Real-Time PCR.

Results: Liposomes were reported with an entrapment percentage of 67.22-86.5, a diameter of 63.8 ± 1.92 µm, a size of 185 nm, a dispersion index of 0.195, a surface charge of -41.7 mV and as spherical vesicles with smooth and uniform surfaces. The minimum inhibitory concentration in the nanoliponiosomes treatment group for the three selected resistant isolates 9, 1, and 10 was 2.156, 2.156, and 39 µg/mL, respectively and the reduction of *ERG11* gene expression in them was reported to be 1.23, 1.04, and 1.17 times compared to the untreated group, respectively.

Conclusion: Thymol nanoliposomes can be considered an effective combination in reducing fluconazole resistance; however, more extensive research is needed in vitro and in vivo conditions.

Keywords: Nanoliponiosomes, Thymol, *Candida albicans*, Fluconazole, Drug Resistance.

Corresponding Author:
Mohaddeseh Larypoor; Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran;
Email: m.larypoor@iau.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

بررسی اثر ضدقارچی نانولیپونیوزوم‌های بارگذاری‌شده با تیمول بر بیان‌ژن *ERG11* در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول

محدثه لاری پور[1*]، حورا دادگستر[1]، محمدرضا رضوی[2]، زهرا گودرزقلعه مهدیخانی[3]

۱- دانشکدهٔ علوم‌زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۲- بخش انگل شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳- دانشکدهٔ علوم‌زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت *کاندیدا آلبیکنس* به فلوکونازول و نقش ژن *ERG11* در این پدیده چالشی مهم است. این پژوهش با تمرکز بر ترکیب‌های طبیعی ضدقارچ مانند تیمول، اثر ضدقارچیِ لیپونیوزوم حامل تیمول را بر بیان‌ژن *ERG11* بررسی می‌کند.

مواد و روش ها: مقاومت به فلوکونازول و وجود ژن *ERG11* با استفاده از روش PCR در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از نمونه‌های بالینی بررسی شد. تیمول خریداری و تهیهٔ لیپونیوزوم حاوی تیمول به روش لایهٔ نازک و آب انجام شد. سرعت انتشار، ظاهر، ساختار شیمیایی، اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زِتای لیپونیوزوم‌ها موردبررسی قرار گرفت. آزمایش آنتی‌بیوگرام انجام شد و اثر زیرحداقل غلظت مهارکننده (Sub-MIC) بر بیان‌ژن *ERG11* در جدایه‌های مقاوم با استفاده از روش Real-Time PCR موردارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: لیپوزوم‌ها با درصد به دام افتادن ۶۷/۲۲-۸۶/۵، قطر ۱/۹۲ ± ۸/۶۳ میکرومتر، اندازهٔ ۱۸۵ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۱۹۵، بار سطحی ۴۱/۷- میلی‌ولت و به‌صورت وزیکول‌های کروی با سطوح صاف و یکنواخت گزارش شدند. حداقل غلظت بازدارندگی در گروه تیمار با نانولیپونیوزوم برای سه جدایهٔ منتخب مقاوم ۹، ۱ و ۱۰ به‌ترتیب ۲/۱۵۶، ۲/۱۵۶ و ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کاهش بیان‌ژن *ERG11* در آن‌ها نسبت به گروه غیرتیمار به‌ترتیب ۱/۲۳، ۱/۰۴ و ۱/۱۷ برابر گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نانولیپوزوم‌های تیمول را می‌توان ترکیبی مؤثر در کاهش مقاومت فلوکونازول درنظر گرفت، البته به تحقیق‌های گسترده‌تری در شرایط *in-vitro* و *in-vivo* نیاز می‌باشد.

واژگان کلیدی: نانولیپونیوزوم، تیمول، *کاندیدا آلبیکنس*، فلوکونازول، مقاومت دارویی.

***نویسندهٔ مسئول:** محدثه لاری پور؛ دانشیار گروه میکروبیولوژی،
دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران؛
پست الکترونیکی: m.larypoor@iau.ir

تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش:۱۴۰۴/۰۲/۳۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

۱- مقدمه

مقاومت ضدمیکروبی، یکی از ده تهدید اصلیِ سلامت عمومی است و علاوه‌بر از دست دادن جان میلیون‌ها نفر، سالانه منجر به هزینه‌های اجتماعی و اقتصادی قابل‌توجهی نیز می‌شود. بانک جهانی تخمین می‌زند که مقاومت ضدمیکروبی تا سال ۲۰۵۰ منجر به ۱ تریلیون دلار هزینهٔ اضافی در مراقبت‌های بهداشتی خواهد شد (۱) و با توجه به افزایش روزافزون سرانهٔ مصرف عوامل ضدمیکروبی و ظهور پاتوژن‌های مقاوم، بررسی عوامل مؤثر در کاهش مقاومت ضدمیکروبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعه‌های گسترده‌ای پیرامون پاتوژن‌های مقاوم و عوامل مؤثر بر آن‌ها انجام شده است. از پاتوژن‌های مقاوم می‌توان به گونه‌های مختلف قارچی اشاره نمود که به‌عنوان عوامل تهدیدکنندگی برای سلامت موردتوجه هستند، گونه‌های کاندیدا[۱] از جمله این قارچ‌ها می‌باشند که می‌توانند مشکلات عدیده‌ای را در درمان، تشخیص و مراقبت‌های بهداشتی ایجاد کنند و در بسیاری از موارد نیز عامل مرگ‌ومیر و عوارض قابل‌توجهی باشند (۲). ارتباط بین گونه‌های کاندیدا و میزبان آن‌ها به تعداد میکروارگانیسم، قدرت بیماری‌زایی گونه‌ها و مقاومتِ میزبان بستگی دارد. قارچ *کاندیدا آلبیکنس*[۲] شایع‌ترین گونه در این جنس می‌باشد و به‌عنوان فلور نرمال در حفرهٔ دهانی، لولهٔ گوارش و واژن در بدن محسوب می‌شود (۲، ۳). *کاندیدا آلبیکنس* قدرت بیماری‌زاییِ قابل‌توجهی دارد و می‌تواند اندام‌های مختلفی را هدف قرار داده و انواع مختلف عفونت‌های بالینیِ کاندیدیازیس[۳] را سبب شود (۳، ۴). امروزه انواع سویه‌های مقاوم این قارچ در انواع اشکالِ بالینی ظاهر شده است و اغلب این سویه‌ها به‌عوامل ضدمیکروبیِ بالاخص آزول‌ها مقاوم هستند (۵، ۶). از جمله داروهای آزول که مقاومت به آن منجر به نگرانی شده است، می‌توان به فلوکونازول[۴] اشاره نمود. فلوکونازول یک عامل ضدقارچ با طیف وسیع می‌باشد. فلوکونازول در مقایسه با دیگر آزول‌ها اثر اختصاصی‌تری بر روی آنزیم سیتوکروم P450[۵] قارچی نسبت به نوعِ انسانی داشته و دارای عوارض و تداخل‌های کمتری نیز می‌باشد. همچنین فلوکونازول با اثر بر روی آنزیم ۱۴-آلفادِمتیلاز (Erg11p)[۶] که توسط ژن *ERG11* (ژن شمارهٔ ۱۱ در مسیر بیوسنتز ارگوسترول) سنتز می‌شود و در تبدیل لانسترول[۷] به ۱۴-دِمتیل‌لانسترول[۸] دخالت دارد، باعث مهار اثرگذاری آنزیم و کاهش سطح ارگوسترول می‌شود (۶، ۷). هنگامی‌که Erg11p مهار می‌شود، سایر آنزیم‌های موجود در مسیر (Erg6p، Erg25p، Erg26p، Erg27p و Erg3p) یک استرول سمّی ضدقارچی به نام ۱۴-آلفامتیل‌ارگوستا۸-۲۴(۲۸)دینول[۹] را سنتز می‌کنند. علاوه‌بر این، آزول‌ها مسئول افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن هستند و بدین ترتیب رشد قارچ‌ها را مهار می‌کنند (۸).

به‌منظور بررسی عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت، مطالعه‌های گسترده‌ای انجام‌شده و انواع مختلفی از مکانیسم‌های مولکولی در پیدایش فنوتیپِ مقاومتِ دارویی در سلول‌های یوکاریوت قارچی شناسایی شده است. از جملهٔ این مکانیسم‌ها می‌توان به کاهش انتقال دارو به داخل سلول، تجزیهٔ ارگوسترول[۱۰] در مسیر بیوسنتزیِ آن، افزایشِ سطوحِ هدفِ سلولیِ داروهای آزولی و افزایش انتشار دارو از سلول توسط پمپ‌های افلاکس غشایی اشاره نمود (۸، ۹). به‌دنبال مطالعه‌های ژنتیکی، انواعی از ژن‌هایی که در ایجاد مقاومت دارویی نقش دارند شناسایی شدند، بیان بیش از حد ناقل‌های غشایی مانند ناقل‌های کاست متصل‌شونده به ATP (ABC-T)[۱۱] و ناقل‌های تسهیل‌کنندهٔ اصلی (MFS-T)[۱۲]، که توسط ژن‌های *CaCDR1*، *CaCDR2* و *CaMDR1* تنظیم می‌شوند با مقاومت به آزول‌ها از جمله فلوکونازول مرتبط می‌باشد (۸، ۱۰، ۱۱). همچنین بیان بیش از حد *ERG11* با مقاومت آزول در بسیاری از قارچ‌ها مرتبط است. چندین جهشِ نقطه‌ای در *ERG11* در ایزوله‌های بالینیِ مقاوم شناسایی شده است. علاوه‌بر *ERG11*، *ERG3* و *ERG6* نیز با مقاومت به آزول و تشکیلِ ترکیب‌های سمّی مرتبط هستند. از طرفی دیگر Upc2p یک فاکتورِ رونویسی است که اکثر ژن‌های بیوسنتز ارگوسترول را تنظیم می‌کند و جهش در ژن سنتزکنندهٔ آن (*CaUPC2*) از جمله عوامل مرتبط با مقاومت به آزول‌ها

[1] بقه*Candida* species
[2] *Candida albicans*
[3] Candidiasis
[4] Fluconazole
[5] Cytochrome P450
[6] 14 – α demethylase (Erg11p)
[7] Lanosterol
[8] 14-Demethyllanosterol
[9] 14α methylergosta 8-24 (28) dienol
[10] Ergosterol
[11] (ATP)-Binding Cassette Transporters (ABC-T)
[12] Major Facilitator Superfamily Transporters (MFS-T)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

می‌باشد (۸، ۱۰). در بررسی‌های انجام‌شده در تعدادی از ایزوله‌های بالینیِ *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به آزول‌ها، بیان بیش از اندازه در ژن *ERG11* مشاهده شده است. همچنین دیده‌شده است که حذف این ژن در *کاندیدا آلبیکنس* حساسیّت آزولیِ این مخمر را افزایش می‌دهد. مطالعه‌های انجام‌شده، نقش ژن *ERG11* در مقاومت به آزول‌ها خصوصاً فلوکونازول را اثبات کرده‌اند (۱۱، ۱۲). از دیرباز مواد طبیعیِ مؤثر در پیشگیری و درمان عفونت‌ها مانند ترکیب‌های گیاهی موردتوجه بشر بوده‌اند. امروزه نیز با توجه به نیاز به کشف ترکیب‌های ضدمیکروبی، محققان به بررسی اثر ضدمیکروبیِ این ترکیب‌ها مخصوصاً اسانس‌های گیاهی می‌پردازند. از جملهٔ این گیاهان، می‌توان به گیاه زِنیان اشاره نمود. گیاه زنیان[1] متعلق به خانوادهٔ چتریان است که به‌صورت خودرو رشد می‌کند (۱۳). این گیاه از ترکیب‌ها و اجزای گوناگونی مانند فیبر، کربوهیدرات، ساپونین، چربی، پروتئین، گلیکوزید، تانن، کلسیم، آهن، ید، منگنز، کبالت، مس، فسفر، تیامین و ریبوفالوین تشکیل شده است. میوهٔ این گیاه شامل ۲-۹ درصد روغن قهوه‌ایِ رنگی است که به آن روغن اجوان[2] گفته می‌شود و جزء اصلی این روغن، تیمول[3] (۳۵-۶۱ درصد) می‌باشد. اجزای غیرتیمولیِ تشکیل‌دهنده همچنین شامل پارا‌سایمن، گاما ترپینن، آلفا پینن، بتا پینن، آلفا ترپینن، استایرن، دلتا ۳ کارن، آلفا فالندرن و بتا فالندرن می‌باشند (۱۴). تیمول جزء اصلی اسانسِ گیاه زنیان است که یک ترکیب فنل مونوترپنوئیدی و ایزومر کارواکرول است. تیمول دارای چندین خاصیت بیولوژیکیِ ضدقارچ، ضداسپاسم، ضدسرطان، ضدانعقاد، ضدالتهاب، ضدمیکروب و آنتی‌اکسیدان می‌باشد (۱۴، ۱۵). با توجه به ماهیّت حساس اسانس‌های گیاهی و افزایش روزافزونِ علم‌وفناوری استفاده از حامل‌های دارو و انجام فرایند انکپسولاسیون برای این ترکیب‌ها بسیار مطرح می‌باشد. فرایند انکپسولاسیون[4] تکنیکی بسیار مؤثر برای کنترل رهایش و حفظ ترکیب‌های حساس محسوب می‌شود (۱۶). تکنولوژی‌های مختلفی برای انکپسوله کردن وجود دارند که می‌توان از آن‌ها در صنایع‌غذایی و دارویی بهره جست. از جمله حامل‌هایی که براساس این تکنولوژی‌ها به‌دست می‌آیند، می‌توان به میسل‌های سورفاکتانت[5]، نانوسفرها[6]، نانوذرات[7]، نانوکوکلئات‌ها[8]، لیپوزوم‌ها[9] و نانونیوزوم‌ها[10] اشاره نمود (۱۷، ۱۸). از این میان لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها در مطالعه‌های مختلفی به‌عنوانِ حاملِ دارو موردبررسی قرار گرفته‌اند. لیپوزوم‌ها، وزیکول‌های بسیارکوچکی هستند که از یک حفرهٔ مرکزی محتوی آب یا محلول آبی و یا یک یا چند لایهٔ فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند، بنابراین قادرند گسترهٔ وسیعی از داروها را در خود محبوس نمایند (۱۶-۱۸). نیوزوم‌ها، وزیکول‌های سورفاکتانت غیریونی هستند که در اثر هیدراتاسیون سورفاکتانت غیریونی مرکب یا بدون اختلاط کلسترول و دیگر چربی‌ها تشکیل می‌گردند (۱۶، ۱۹). نیوزوم‌ها از نظر عملکردی مشابه لیپوزوم‌ها می‌باشند، به‌طوری‌که هر دو می‌توانند در سیستم‌های دارورسانی هدفمند و کنترل‌شده به‌کار روند، فراهمیِ زیستی را افزایش داده و میزان پاک‌سازی حذفی دارو را کاهش دهند. ویژگی‌های هر دو ساختار یادشده، به ترکیب دو لایه و روش تهیهٔ آن‌ها بستگی دارد (۱۸، ۱۹). در این راستا، این مطالعه با هدف بررسی اثرهای ضدقارچی لیپونیوزوم‌های حاوی تیمول بر بیان‌ژن *ERG11* در گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول که توسط گودرز قلعه مهدیخانی و همکاران از نمونه‌های بالینی جداسازی شده بودند انجام شده است (۲۰).

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه و نگهداری مخمرها

تعداد ۱۲۶ ایزولهٔ بالینیِ قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مطالعه‌ای توسط گودرز قلعه مهدیخانی و همکاران، پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با کد IR.IAU.PS.REC.1398.211 جداسازی شده و پس از شناسایی، در دمای ۲۱- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید (۲۰). جدایه‌ها و سویهٔ استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC5027 تهیه شد و پس از احیاء، در محیط

[1] Trachyspermum
[2] Ajwain oil
[3] Thymol
[4] Encapsulation
[5] Surfactant micelles
[6] Nanospheres
[7] Nanoparticles
[8] Nanocochleates
[9] Liposomes
[10] Nanoniosomes

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

پوتیتو دِکستروز آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

۲-۲- ارزیابی حساسیت دارویی

ارزیابیِ حساسیتِ دارویی به فلوکونازول به روش دیسک دیفیوژن و براساس استاندارد ClSI 2022 انجام شد. به‌این‌ترتیب که در ابتدا استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند با استفاده از محلول ۱ درصد اسید سولفوریک و محلول آبی ۱/۱۷۵ درصد کلریدباریم آماده‌سازی شد. برای ارزیابیِ حساسیتِ دارویی، نمونهٔ استاندارد و ۲۵۱ ایزولهٔ بالینیِ *کاندیدا آلبیکنس*، سوسپانسیونِ سلولی براساس نیم مک‌فارلند به تعداد $۱۰^{۶} \times ۱$ سلول در یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) حاوی مکمل‌های گلوکز به‌میزان ۲ درصد و متیلن‌بلو به‌میزان ۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با سواپ استریل به‌صورت چمنی کشت داده شد، سپس دیسک‌های ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول بعد از ۱۵ دقیقه در مرکز هریک از پلیت‌ها قرار داده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (۲۱).

۲-۳- بررسی حضور ژن *ERG11* در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول با روش PCR

بعد از تأیید بیوشیمیایی سویه‌های مقاوم، استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستیِ ایران صورت گرفت. تعیین غلظت محصولِ استخراجِ DNA، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و بررسی کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی گردید. بررسی حضور ژن *ERG11* با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی با تکنیک PCR[۱] انجام شد. مواد واکنش PCR از شرکت سیناکلون تهیه شد. توالی پرایمرهای استفاده‌شده شامل پرایمر رفت: 5′-TTTGGTGGTGGTAGACATA-3′ و پرایمر برگشت: 5′-GAACTATAATCAGGGTCAGG-3′ می‌باشند (۲۲). توالی پرایمرها به شرکت Bioneer کره برای سنتز ارسال شد. واکنش به‌صورت ۳۵ سیکل شامل مراحل دِناتوراسیون (۳۰ ثانیه در ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد)، اتصال (۳۰ ثانیه در ۴۳ درجهٔ سانتی‌گراد) و طویل‌سازی (۳۰ ثانیه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد) در ترموسایکلر[۲] (آپندورف مستر سایکلر، آلمان) انجام گرفت. درنهایت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز و ژل‌داک (Bio-Rad Sub-Cell GT، آمریکا) بررسی گردید.

۲-۴- سنتز لیپونیوزوم با بارگذاریِ تیمول به‌روش آب‌پوشان لایهٔ نازک

سنتز نانولیپونیوزوم به‌روش آب‌پوشان لایهٔ نازک انجام شد. مقدار کل فازِ چربیِ تشکیل‌دهندهٔ لیپونیوزوم‌ها ۳۱۱ میکرومول درنظر گرفته شد که ۶۱ درصد مولی این مجموعه متشکل از اسپن ۴۱، توین ۴۱ و لسیتین با مقادیر مساوی و ۴۱ درصد مولی کلسترول (سیگما، آلمان) درنظر گرفته شد. در این روش، ابتدا اجزای تشکیل‌دهنده شامل سورفکتانت‌های غیریونی لسیتین، کلسترول و تیمول (سیگما، آلمان) به‌مقدار ۱/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فرمولاسیونِ نهایی، از محلول‌های استوک برداشته و به بالن ته‌گرد ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و بالن به دستگاه روتاری (Heidolph، آلمان) متصل شد. دمای بن‌ماری دستگاه، روی عدد ۷۱ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت چرخش بالن روی عدد ۱۸۱ دور بر دقیقه تنظیم گردید و عمل تبخیر به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در ادامه فیلم نازکی از اجزای فاز چربی بر روی دیوارهٔ داخلیِ بالن ایجاد شد و به‌مدت ۲۴ ساعت تا خشک شدن کامل در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. جهت هیدارته نمودن فیلم چربی و تشکیل لیپونیوزوم، ۵ سی‌سی آب دیونیزه (۷۱ درجهٔ سانتی‌گراد) به بالن اضافه گردید و سپس با استفاده از دستگاه روتاری به‌مدت ۳۱ دقیقه و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و با سرعت چرخش ۱۱۱ دور بر دقیقه عمل تبخیر انجام شد. برای تکمیلِ مرحلهٔ هیدراتاسیون، فرمولاسیون‌ها در ویال‌های شیشه‌ای از نوع بوروسیلیکات به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند و سپس برای نگهداری طولانی‌مدت‌تر به یخچال منتقل شدند (۲۳).

۲-۵- رهایش تیمول از نمونه‌های لیپونیوزومی

برای بررسیِ آزادسازی دارو از سل انتشار مدل Franz که از جنس شیشه بود استفاده شد (۲۴). در بخشِ گیرنده از آب و اتانول ۵۱/۵۱ درصد حجمی استفاده گردید. مقدار یک میلی‌لیتر از سوسپانسیونِ لیپونیوزوم حاوی دارو به آرامی در سطح غشای سلولز استات در بخشِ دهنده پخش شد.

[۱] Polymerase chain reaction

[۲] Thermal Cycler

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

محیط بخشِ گیرنده توسط مگنت استیرر با دور متوسط برای توزیعِ یکنواختِ غلظتِ داروی آزاد فازِ گیرنده دائماً مخلوط شد و در زمان‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۱ و ۷۲ ساعت از محیط نزدیک مگنت ۱ میلی‌لیتر نمونه‌برداری با رعایت جایگزینیِ ۱ میلی‌لیتر فازِ گیرنده انجام گرفت. برای تعیین مقدارِ تیمولِ نمونه‌های حاصل، جذبِ محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV (Shimadzu، ژاپن) اندازه‌گیری شد.

۲-۶- بررسی شکل ظاهری و عملکردی لیپونیوزوم

شکل ظاهری لیپونیوزوم، با میکروسکوپ الکترونی روبشی[1] SEM (SEM; JEOL JSM-7001FA، ژاپن) با ولتاژ شتاب‌دهی ۵ تا ۱۵ کیلوولت بررسی گردید. برای جلوگیری از باردارشدن و تخریب وزیکول‌ها، وزیکول‌ها با لایهٔ ۱۱ نانومتری از طلا توسط Sputter Coater Coxem پوشانده شدند. برای بررسیِ ساختارِ شیمیاییِ نانوذراتِ لیپونیوزوم حاملِ تیمول از روش طیف‌سنجیِ تبدیلی مادون قرمز[2] (FTIR) استفاده شد. برای این کار، نانوذرهٔ لیپونیوزوم حاملِ تیمول با پودر پتاسیم بروماید مخلوط‌شده و سپس به کمک دستگاه پرس به شکل قرص درآمد؛ قرصِ حاصله در داخلِ سل دستگاه قرار گرفت و طیف FTIR توسط دستگاه FTIR (Bruker Tensor 27، آلمان) آن ثبت شد. به‌منظور تعیین اندازه، شاخص پراکندگیِ ذرات و پتانسیلِ زتا از دستگاه تفرق نور پویا[3] DLS1 (Malvern Zetasizer Nano ZS، بریتانیا) استفاده شد.

۲-۷- رسم طیف‌جذبیِ تیمول

تیمول (سیگما، آلمان) خریداری شد و به‌منظور تأیید، طیف جذبی بررسی و رسم گردید. به‌منظور رسم طیف جذبی، غلظت ۱۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیمول در اتانول ۹۶ درصد تهیه و سپس با استفاده از آب دیونیزهٔ محلول به‌میزان دو برابر رقیق و طیف جذبی در محدودهٔ ۲۱۱ تا ۷۱۱ نانومتر با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies، آمریکا) رسم گردید. همچنین برای رسم نمودار استانداردِ تیمول، غلظت‌های متفاوت از تیمول در حلّال مربوطه، تهیه و جذب‌ها ۵ بار خوانش شده و میانگین آن‌ها برای رسم نمودار استاندارد مورداستفاده قرار گرفت.

۲-۸- تعیین درصد محبوس‌سازی تیمول

برای تعیین مقدار تیمول بارگیری‌شده در لیپونیوزوم، ابتدا یک سی‌سی از سوسپانسیونِ لیپونیوزومی داخل یک میکروتیوب ریخته شد و به‌مدت ۳۱ تا ۴۵ دقیقه در سرعت ۱۴۱۱۱ دور بر دقیقه سانتریفیوژ (Hettich Rotanta، آلمان) شد. سپس حدود ۵۱۱ میکرولیتر فازِ بالایی از محلولِ رویی جداسازی گردید. در ادامه حدود ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپیلِ الکل اضافه شد تا فازِ پایینی که حاوی سهم عمده‌ای از دارو و پلت است شفاف شود. برای تعیین مقدار تیمول نمونه‌های حاصل براساس جذبِ نوری از دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول‌موج ۴۸۱ نانومتر استفاده شد. پس از تبدیلِ جذب به غلظت توسط منحنیِ استاندارد تیمول و اعمال ضریبِ رقّت ناشی از افزودن ایزوپروپیل الکل، درصد محبوس‌سازی با نسبت غلظتِ دارو در پلت به‌کل غلظتِ تیمول در لیپونیوزوم محاسبه شد.

۲-۹- بررسی توزیع اندازهٔ ذره‌ای لیپونیوزوم‌ها

به‌منظور بررسیِ اندازهٔ ذرات لیپونیوزومی از دستگاه مالورن با لنز ۱۱۱ و سرعت چرخشِ ۱۹۱۱ دور در دقیقه استفاده گردید. اندازهٔ ذره‌ای هر فرمولاسیون با استفاده از این روش سه مرتبه تعیین شد.

۲-۱۰- آنتی‌بیوگرام

تست آنتی‌بیوگرام براساس پروتکلِ مرجعِ CLSI 2022 انجام شد. هدف از انجام این آزمایش، تعیین MIC قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و حداقل غلظت‌کشندگیِ قارچ[4] (MFC) *کاندیدا آلبیکنس* تیمول و نانولیپونیوزوم تیمول موردبررسی بود.

تعیین حداقل غلظتِ مهارکنندگی با استفاده از تهیهٔ رقّت سریالی در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. برای این تست از محیط‌کشت سابورو دکستروز براث (به‌عنوان کنترل محیط‌کشت)، استوک تیمول یا نانوذره به‌همراه سوسپانسیونِ استاندارد نیم مک‌فارلند *کاندیدا آلبیکنس* (به‌عنوان کنترل دارو)، استوک *کاندیدا آلبیکنس* (به‌عنوان

[1] Scanning Electron Microscope
[2] Fourier-transform infrared spectroscopy
[3] Dynamic light scattering
[4] Minimum fungicidal concentration

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

کنترل مثبت) استوک قارچ به‌همراه آمفوتریسین B[1] (به‌عنوان کنترل منفی)، استوک تیمول یا نانوذره و جدایه‌های قارچی استفاده شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. این آزمون برای هر جدایهٔ قارچی با دوبار تکرار انجام شد. باتوجه به عدم‌حلّالیت در آب برای ساخت استوک تیمول و نانوذره، از اتانول ۷۱ درصد به‌عنوان حلّال استفاده گردید. همچنین برای ساخت استوک آمفوتریسین B، از محیط‌کشت سابورو دِکستروز براث استفاده شد.

به‌منظور تعیین حداقل غلظتِ کشندگیِ قارچ، از چاهک‌هایی با غلظت بالاتر از MIC، حدود ۱۱ میکرولیتر بر روی محیط پوتیتو دِکستروز آگار کشت داده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید (۲۵).

۲-۱۱- بررسی میزان بیان‌ژن *ERG11* با روش Real-Time PCR

استخراج RNA سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول طبق دستورالعمل کیت Sina Pure RNA (سیناکلون-ایران) انجام شد. بررسی غلظت و خلوص RNA با خوانشِ میزانِ جذب نوری با استفاده از دستگاه نانودراپ و کیفیت تخلیص با استفاده از تکنیک الکتروفورز انجام شد. نتیجهٔ ژل با استفاده از دستگاه ژل‌داک بررسی و عکس‌برداری شد. سنتز cDNA، طبق دستورالعملِ کیت سنتز cDNA (سیناکلون-ایران) انجام گرفت. محصول واکنش برای یک هفته در دمای ۲۱- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. ژن *ACT* به‌عنوان کنترل داخلی برای بررسی بیان‌ژن استفاده گردید. بهینه‌سازی شرایط تکثیر با غلظت‌های مختلف یون منیزیم انجام شد. مواد واکنش PCR از شرکت سیناکلون تهیه‌شده و پرایمرهای مورداستفاده برای *ERG11* شامل

پرایمر رفت: 5'-TTGGTGGTGGTAGACATA-3'

و پرایمر برگشت: 5'-TCTGCTGGTTCAGTAGGT-3'

و برای ژن *ACT* پرایمر رفت:

5'-ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC-3'

و پرایمر برگشت:

5'-GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA-3'

می‌باشند. توالی پرایمرها به شرکت Bioneer کره برای سنتز ارسال شدند. واکنش به‌صورت ۴۱ سیکل شامل مراحل دِناتوراسیون (۱۵ ثانیه در ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد)، اتصال (۲۵ ثانیه در ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد) و طویل‌سازی (۲۵ ثانیه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد) در دستگاه ROTORGENE- Q (Qiagen، آلمان) انجام گرفت (۲۶).

۲-۱۲- روش‌ها و ابزار تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS (Ver.24) برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های به‌دست‌آمده استفاده شد.

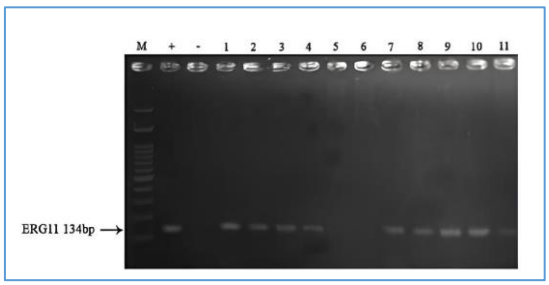
۳- نتایج

۳-۱- نتایج تست بررسی حساسیت دارویی

قطر هالهٔ عدم‌رشد اندازه‌گیری شده و براساس جدول CLSI 2022 جدایه‌های مقاوم شناسایی شدند. از میان ۱۲۶ جدایهٔ بالینیِ *کاندیدا آلبیکنس*، در مجموع ۱۱ جدایهٔ بالینیِ *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به داروی فلوکونازول شناسایی گردید. به‌منظور سهولت در انجام مراحلِ بعدی، جدایه‌های بالینیِ *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به داروی فلوکونازول، مجدداً از ۱ تا ۱۱ شماره‌گذاری شدند.

۳-۲- بررسی حضور ژن *ERG11*

در ادامه ۱۱ جدایهٔ *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول نسبت به حضور ژن *ERG11* به‌روش PCR موردبررسی قرار گرفتند و از این تعداد، ۹ جدایهٔ *کاندیدا آلبیکنس* دارای ژن *ERG11* بوده و به‌عنوان جدایهٔ مقاوم به فلوکونازول گزارش شدند. نتایج ژل‌داک محصولات PCR در شکل ۱ نشان داده شده است.



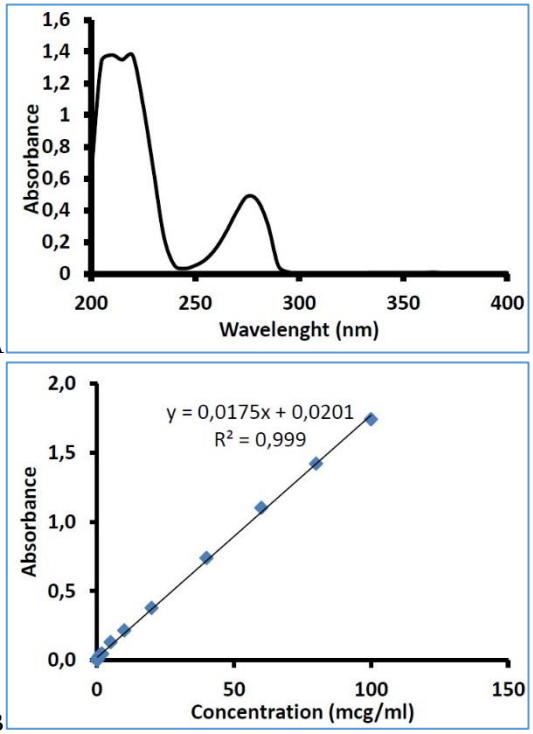
شکل ۱- باند DNA از قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (M: نشانگر DNA ۱۳۴جفت باز، + : کنترل مثبت، ـ : کنترل منفی، ۱۱-۱: بیان‌ژن *ERG11* در *کاندیدا آلبیکنس* درجدایه‌های مقاوم به فلوکونازول)

[1] Amphotericin B

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

۳-۳- طیف جذبیِ تیمول و نمودارِ استاندارد

نمودار استاندارد تیمول در شکل 2B نشان داده شده است. محلول تیمول در محدودهٔ مرئی هیچ جذبی نداشت و نتیجه در بازهٔ ۲۱۱ تا ۴۱۱ نانومتر در شکل 2A مشاهده شد.



شکل۲- A) طیف جذبی تیمول، B) نمودار استاندارد تیمول

۴-۳- رهایش تیمول از نمونه‌های لیپونیوزومی

میزان رهایشِ تیمول در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در مدت زمان ۷۱ ساعت محاسبه گردید. پروفایل آزادسازی تیمول در شکل 4A به‌شکل میانگین ± انحراف استاندارد مشاهده می‌شود. همان‌گونه که در نمودار مشاهده می‌شود، نمودار دارای دو فازِ نمایی است که در فازِ اول، شیبِ غلظتِ ایجادشده بین تیمول درون لیپونیوزوم و بافر، یک رهایش نسبتاً سریع را نشان داد و در فازِ دوم، شیبِ نمودار رهایش دارو کاهش یافت. داده‌های حاصل از بررسی الگوی رهایش دارو نشان داد که بالاترین میزان رهایش عصاره در ۶ ساعت اول می‌باشد و در ادامه با رهایشِ آهسته‌تر دارو میزان رهایش ثابت می‌شود.

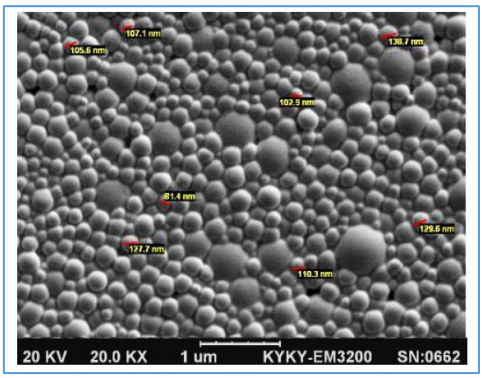
۵-۳- شکل ظاهری و عملکردی لیپونیوزوم

شکل ظاهریِ لیپونیوزومِ نهایی در شکل ۳ قابل‌مشاهده می‌باشد و نشان می‌دهد که فرم نانوحامل، وزیکولی و کروی بوده و دارای سطحی صاف و هموار است و از ویژگی‌های ظاهریِ مطلوبی برخوردار می‌باشد.

جهت بررسیِ انکپسوله شدن تیمول در داخلِ نانوحامل لیپونیوزوم، طیف FTIR تیمول خالص و نانولیپونیوزوم حامل تیمول در محدودهٔ اعداد موجی ۵۰۰ cm^{-1} تا ۳۵۰۰ cm^{-1} رسم گردید. نتایج FTIR تیمولِ خالص در شکل 4B آورده شده است. باند در ۳۲۲۷ cm^{-1} به ارتعاشِ کششیِ O-H فنولی اختصاص می‌یابد و ارتعاشِ خمشی در ۱۶۲۲ cm^{-1} مشاهده می‌شود. ارتعاش کششی C=C حلقهٔ آروماتیکی در ۱۵۸۵ cm^{-1} مربوط به ساختار بنزن آروماتیک است. ارتعاشِ کششیِ متقارن و نامتقارنِ C-H به‌ترتیب در ۲۸۶۷ cm^{-1} و ۲۹۰۰-۲۹۶۰ cm^{-1} قرار گرفته است. در ۱۵۱۷ cm^{-1} ارتعاش کششی باند دوگانهٔ C=C به‌چشم می‌خورد. همچنین باندهای اورتون در محدودهٔ ۱۸۰۰-۲۱۰۰ cm^{-1} دیده می‌شوند. ارتعاش‌های خمشی در صفحه و خمشیِ خارج از صفحه C-H به‌ترتیب در ۱۳۰۰-cm^{-1} ۱۰۳۵ و ۶۰۰-۷۵۰ cm^{-1} مشاهده می‌شود. طیف FTIR مربوط به نانولیپونیوزوم حامل تیمول در شکل 4C آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، باندهای مربوط به تیمول حذف شده‌اند؛ ارتعاش‌ها با شدت بالا در ساختار لیپیدیِ نانوحامل در ۳۴۴ cm^{-1}، ۱۶۴۳ cm^{-1} و ۱۰۴۴ cm^{-1} به‌ترتیب به ارتعاشِ کششیِ O-H، ارتعاشِ خمشیِ O-H (که با ارتعاشِ C=C ساختارِ لیپیدی هم‌پوشانی داشته است) و ارتعاشِ کششیِ C-O مربوط است. درنهایت نتایج به‌دست‌آمده قرارگیریِ تیمول در ساختار نانوحامل را تأیید نمود.

داده‌های به‌دست‌آمده از دستگاه DLS مطابق شکل 4D گزارش شد. اندازهٔ نانولیپونیوزوم حاملِ تیمول ۱۸۵ nm و میزان شاخصِ پراکندگی ذرات (PDI) ۱/۱۹۵ نشان داده شده است. همچنین میزان شارژ سطحی (پتانسیل زتا) برای نانولیپونیوزوم‌های حامل تیمول ۴۱/۷ mV- می‌باشد که با توجه به این مقدار شارژ سطحیِ آنیونی است. پتانسیل زتا برای نانولیپونیوزوم‌های حاوی تیمول در شکل 4E آمده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]



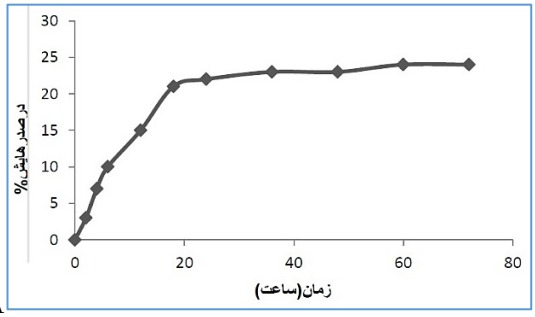
شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانولیپونیوزوم حاملِ تیمول

۳-۶- درصد محبوس‌سازیِ تیمول

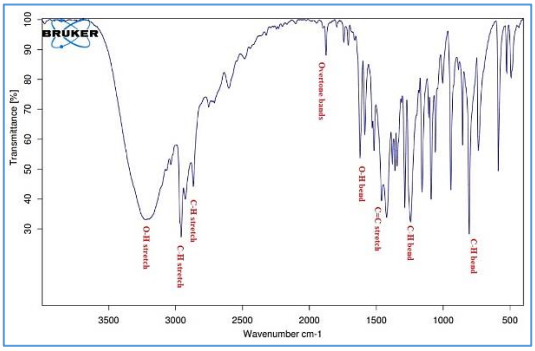
درصد محبوس‌سازی براساس فرمول بیان‌شده، معادل ۶۷/۳۲ درصد محاسبه گردید.

۳-۷- توزیع اندازۀ ذره‌ای لیپونیوزوم‌ها

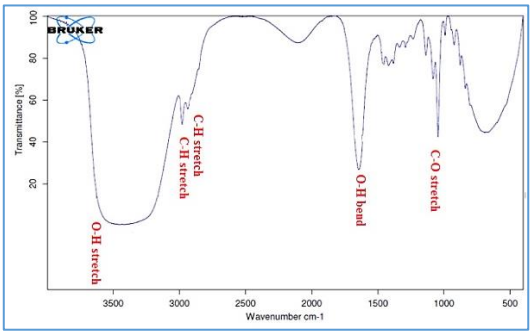
نمودار توزیعِ اندازۀ ذره‌ای لیپونیوزوم‌ها، قبل از سونیکاسیون در شکل ۴F نشان داده شده است. قطر میانگینِ حجمیِ لیپونیوزوم‌ها برابر با ۸/۶۳±۱/۹۲ میکرومتر محاسبه گردید.



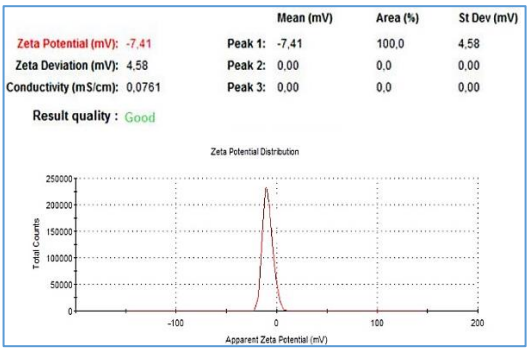
A



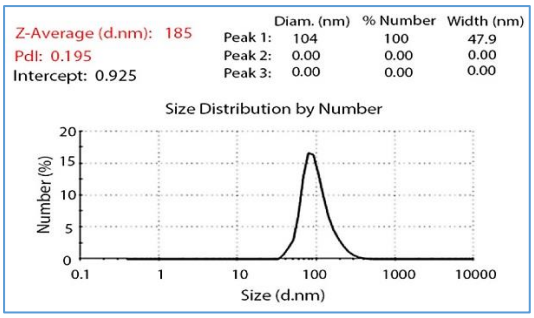
B



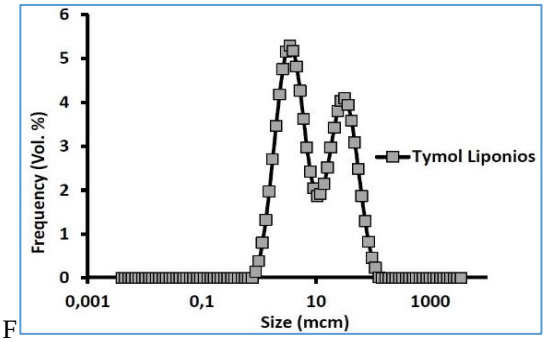
C



D



E



F

شکل۴- A. نمودار رهایشِ تیمول از نانولیپونیوزوم، B. طیف FTIR تیمول، C. طیف FTIR نانولیپونیوزوم حاویِ تیمول، D. پتانسیلِ زتا برای نانولیپونیوزوم‌های حامل تیمول، E. اندازه و شاخصِ پراکندگیِ ذرات برای نانولیپونیوزوم‌های حاملِ تیمول، F. توزیعِ اندازۀ ذره‌ای لیپونیوزومها (zeta average) Z_Average: قطر متوسط نانوذره برحسب نانومتر، PDI: شاخص پراکندگیِ نانوذره، Zeta Potential: پتانسیلِ زتا شاخصی از میزان دفعِ بار بین ذرات با بارِ مشابه در فرمولاسیون)

۳-۸- آنتی‌بیوگرام

حداقل غلظت بازدارندگیِ رشد قابل‌مشاهدۀ تیمول موردبررسی بر روی ۹ جدایۀ مقاوم، چهار جدایۀ حساس و یک جدایۀ استاندارد انجام شد، جدایۀ ۱، ۹ و ۱۱ با توجه به قوی بودن باندهای PCR برای انجام MIC انتخاب شدند و از جدایۀ شمارۀ ۴ به‌عنوان جدایۀ حساس استفاده گردید. نتایج حداقلِ غلظتِ مهارکنندگی و حداقلِ غلظتِ کشندگی نانولیپونیوزوم حاملِ تیمول برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در جدول ۱ مشخص شده است. داده‌های به‌دست‌آمده وارد نرم‌افزار SPSS (Ver.24) شده و ارزش P و یا سطح معنی‌داری برای مقایسۀ حداقلِ غلظتِ مهارکنندگیِ تیمول

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

و نانولیپونیوزوم حاویِ تیمول درنظرگرفته شد و با کنترل از نظر آماری در سطح کمتر از ۱/۱۵ بوده و معنی‌دار می‌باشد (ANOVA, $p< 0.05$).

جدول ۱- نتایج آنتی‌بیوگرامِ تیمول و نانولیپونیوزوم حاملِ تیمول برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس*

جدایه	MIC تیمول (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MIC نانوذرهٔ لیپونیوزوم حاملِ تیمول (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MFC نانوذرهٔ لیپونیوزوم حاملِ تیمول (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۱	۷۸/۲	۷۸/۱	۱۵۶/۲
۲	۷۸/۲	-	-
۳	۷۸/۲	-	-
۴	۷۸/۲	۱۹/۵	۳۹
۷	۷۸/۲	-	-
۸	۳۹	-	-
۹	۱۵۶/۲	۷۸/۱	۱۵۶/۲
۱۰	۳۹	۱۹/۵	۳۹
۱۱	۷۸/۲	۷۸/۱	۳۹

۳-۹- انتخاب ایزوله مناسب برای بررسی بیان‌ژن

بعد از بررسیِ حضور ژن مقاوم توسط PCR، ۳ جدایهٔ (۱، ۹ و ۱۰) که دارای ژن مقاوم بودند، جهت بررسی بیان‌ژن در مقابل نانوذرهٔ لیپونیوزوم حاویِ تیمول انتخاب شدند و از غلظت Sub-MIC نانوذره برای جدایه‌های ۱، ۹ و ۱۰ به‌ترتیب ۱۵۶/۲، ۱۵۶/۲ و ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و جهت استخراج RNA استفاده شدند.

۳-۱۰- بیان‌ژن نمونه‌های قارچ *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول

بررسی میزان بیان‌ژن *ERG11* با روش Real-time PCR و با استفاده از نرم‌افزار Gene X و با محاسبهٔ میزان اختلاف در CT (Cycle Time) ایجادشده نسبت به اینترنال کنترل *ACT1* برای نمونه‌های تیمارشده با نانوذرهٔ لیپونیوزوم حاویِ تیمول و همچنین نمونهٔ غیرتیمار محاسبه گردید. از غلظت Sub-MIC (۳۹، ۱۵۶/۲ و ۱۵۶/۲) استفاده شد. در این مطالعه برای Quantitative Real-time PCR، از رنگ سایبرگرین به‌عنوان شناساگر استفاده گردید. میزان CTهای به‌دست‌آمده، توسط برنامهٔ Gene X نمونهٔ کالیبراتور مقایسه و محاسبه گردید. جدایه‌های موردبررسی که تحتِ تیمار قرار گرفته بودند در مقایسه با سویه‌ای که تحتِ تیمار قرار نگرفته است، افزایش CT را نشان دادند، مقایسهٔ میزان CT در نمونهٔ تحتِ تیمارِ نانوذره و نمونهٔ غیرتیمار در جدول ۲ آورده شده است. سپس میزانِ Fold change ژن موردنظر در نمونهٔ تیمارشده نسبت به نمونهٔ غیرتیمار محاسبه گردید که این مقدار در نمونهٔ ۱ با غلظت ۷۸/۲ برابر با ۱/۲۳ و در نمونهٔ ۹ با غلظت ۷۸/۲ برابر با ۱/۱۴ و در نمونهٔ ۱۰ با غلظت ۱۹/۵ برابر با ۱/۱۷ و میزان p-value به‌ترتیب برابر ۱/۱۳۱، ۱/۲۹۵ و ۱/۱۱۶ بوده است. به بیان دیگر پس از تیمار با نانوذرهٔ موردنظر، بیان این ژن نسبت به نمونهٔ غیرتیمار به‌ترتیب ۱/۲۳، ۱/۰۴، ۱/۱۷ کاهش یافت. نتایج نمودارهای بیان‌ژن *ERG11* در نمونه‌های ۱، ۹ و ۱۰ به‌ترتیب در شکل ۵B، ۵C و ۵D آورده شده است.

جدول ۲- مقایسه میزان CT در نمونهٔ تحت‌تیمار نانوذره و نمونهٔ غیرتیمار

نمونه	غیرتیمار	تحت تیمار
ACT1-1	۱۶/۱۶	۱۶/۲۹
ACT1-2	۱۶/۱۹	۱۶/۳۱
ERG11-S1-1	۱۸/۸۷	۱۹/۴۱
ERG11-S1-2	۱۸/۸۹	۱۹/۳۸
ACT1-1	۱۷/۳۱	۱۷/۴۹
ACT1-2	۱۷/۳۲	۱۷/۵۱
ERG11-S9-1	۱۹/۹۸	۲۱/۴۴
ERG11-S9-2	۲۱/۱۱	۲۱/۴۳
ACT1-1	۱۵/۸۹	۱۶/۲۱
ACT1-2	۱۵/۹۱	۱۶/۲۳
ERG11-S10-1	۱۸/۹۷	۱۹/۵۲
ERG11-S10-2	۱۸/۹۹	۱۹/۵۳

۳-۱۱- آنالیز آماریِ ژن *ERG11*

آنالیز آماریِ ژن *ERG11* در جدایه‌های ۱، ۹ و ۱۰ انجام شد. نتایج آنالیز آماریِ سه جدایه به‌ترتیب در جدول ۳ آورده شده است. جدول بیانگر نتیجهٔ T-Test برای داده‌های موردبررسی می‌باشد. در ستون p-value سطحِ معنی‌داری برای هر ژن مشخص شده است. سطحِ معنی‌داری ۱/۱۵ به‌عنوان سطحِ معنی‌داریِ اصلاح‌شده، جهت تعیینِ معنی‌داری نتایج استفاده گردید. ردیفِ Difference (A-B log scale) بیانگر میزان ddct- برای ژن در گروه تیمارنشده

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

نسبت به گروه تیمارشده، ردیفِ Fold change بیانگر میزان Fold change گروه تیمارنشده نسبت به گروه تیمارشده، ردیف Count بیانگر تعداد نمونهٔ موردبررسی، ردیف Mean بیانگر میانگین در دو نمونه، ردیف STDEV df بیانگر انحراف معیار از میانگین و ردیف Confidence Level بیانگر ضریب اطمینانِ آماری می‌باشد که با ضریب اطمینان ۹۵٪ محاسبه شده است.

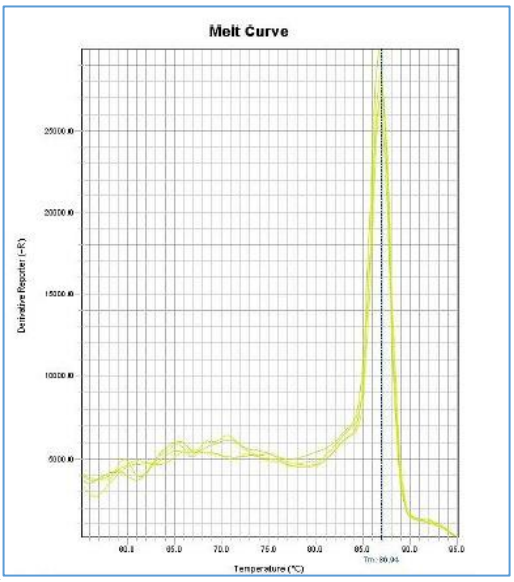
جدول ۳- آنالیز آماری ژن *ERG11* در جدایه های ۱، ۹ و ۱۰

آنالیز آماری ژن *ERG11* در جدایهٔ ۱			
	ERG (untreat)	**ERG (treat)**	**Diff [ERG (untreat,treat)**
Sample1	2.80	3.09	-0.28
Sample 2	4.28	4.6	-0.31
Count	2	2	2
Mean	3.54	3.84	-0.3
STDEV	1.04	1.06	0.02
P-Value			0.03
Confidence Level (14)			95%
Difference (A-B log scale)			-0.3
Fold Change			-1.23
آنالیز آماری ژن *ERG11* در جدایهٔ ۹			
	ERG (untreat)	**ERG (treat)**	**Diff [ERG (untreat,treat)**
Sample1	2.68	2.77	-0.09
Sample 2	4.10	4.13	-0.03
Count	2	2	2
Mean	3.39	3.452	-0.06
STDEV	1.00	0.965	0.04
P-Value			.002
Confidence Level (14)			95%
Difference (A-B log scale)			-0.06
Fold Change			-1.04
آنالیز آماری ژن *ERG11* در جدایهٔ ۱۰			
	ERG (untreat)	**ERG (treat)**	**Diff [ERG (untreat,treat)**
Sample1	3.08	3.30	-0.22
Sample 2	4.44	4.67	-0.23
Count	2	2	2
Mean	3.76	3.99	-0.22
STDEV	0.96	0.96	0.003
P-Value			0.006

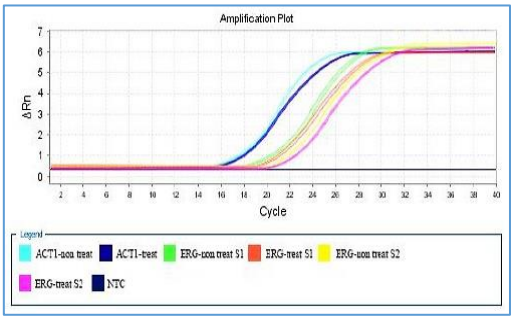
Confidence			95%
Level(14)			
Difference (A-B log scale)			-0.22
Fold Change			-1.17

۳-۱۲- آنالیز منحنی ذوبِ ژن *ERG11*

پس از مشتق‌گیری از نمودار ایجادشده، منحنیِ درجهٔ دومی به دست آمد. همان‌طور که در منحنیِ شکل ۵A آمده است، هر Peak (نقاط ماکزیمم) نمایانگر Tm یک محصول PCR است. با آنالیزِ منحنیِ ذوب، وجود باندهای غیراختصاصی و پرایمر-دایمر بررسی گردید. سرعت تغییرها در واحد زمان در محور y و دمای دستگاه در محور x نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۵A مشاهده می‌شود Tm=۸۶/۹۴ می‌باشد.

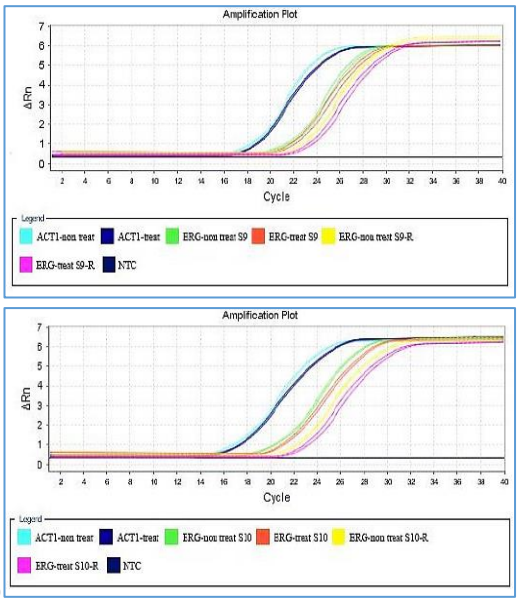


A



B

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]



شکل ۵– A. منحنی ذوبِ ژن *ERG11*، B. میزان بیان‌ژن *ERG11* در نمونهٔ شمارهٔ ۱ نسبت به ژن *ACT1*، C. میزان بیان‌ژن *ERG11* در نمونهٔ شمارهٔ ۹ نسبت به ژن *ACT1*، D. میزان بیان‌ژن *ERG11* در نمونهٔ شمارهٔ ۱۰ نسبت به ژن *ACT1*.

۴- بحث

امروزه با توجه به عوامل ایجادکنندهٔ نقص در سیستم‌ایمنی، عفونت‌های قارچی از جمله کاندیدیازیس از جایگاه خاصی در پزشکی و پژوهش‌ها برخوردار می‌باشند. گونه‌های مختلف کاندیدا در بروز بیماریِ کاندیدیازیس بسیار مؤثر هستند و گونهٔ *کاندیدا آلبیکنس* بیشترین درصد بروز کاندیدیازیس را سبب می‌شود (۲۷، ۲۸). فاکتورهای زیادی در شکل الگوی اپیدمیولوژیک بروز بیماریِ کاندیدیازیس تأثیرگذار هستند، به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط گودرز قلعه مهدیخانی و همکاران انجام شده است، مشخص شد که فاکتورهایی مانند دیابت، مشکلات گوارشی و آلزایمر در افزایش رشد گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* و ایجاد علایم بالینیِ کاندیدیازیس مؤثر می‌باشند (۲۰، ۲۸). وابستگیِ قدرت بیماری‌زاییِ گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* به‌عواملِ دارویی و بروز مقاومتِ دارویی از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین منظور، ارزیابیِ حساسیت یک پاتوژن نسبت به دارو جزء مهمی در درمان و مطالعه‌ها می‌باشد و لازم است تست حساسیتِ دارویی با اندازه‌گیری میزان حداقلِ مهارکنندگیِ رشد در شرایط استانداردِ آزمایشگاهی و استفاده از پروتکل NCCLS انجام گیرد (۲۹). بررسی حساسیتِ دارویی از این جهت حائز اهمیت است که نه‌تنها عدم‌پاسخ به دارو منجر به عود مجدد بیماری می‌شود، بلکه معضل مقاومتِ دارویی را ایجاد خواهد نمود (۳۰). در نتیجه بررسیِ عواملِ مختلفی که بر ایجاد مقاومتِ دارویی مؤثر هستند می‌توانند هدف مطالعه‌های محققان قرار گیرند. به همین منظور به‌دنبال بررسی‌های انجام‌شده بر مقاومت قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به داروهای مختلف، ژن‌های *CDR*، *ERG11*، *MDR1*، *CaSKN1*، *PIL1* و *CaKRE1* مؤثر در ایجاد مقاومتِ دارویی شناسایی شدند (۳۱) و مقاومتِ دارویی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* به دارو های آزول بسیار موردتوجه قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان دادند که بروز جهش‌های شایع بر روی ژن *ERG11* موجب مقاومتِ نسبی نسبت به آزول‌ها می‌شوند (۳۲). براساس بررسی‌هایی که در این پژوهش انجام شد، باند مربوط به حضور ژن *ERG11* در الکتروفورز محصول PCR در تمام ایزوله‌هایی که به فلوکونازول مقاومت نشان دادند مشاهده گردید؛ این امر نشانگر اهمیت بیان‌ژن *ERG11* در بروز مقاومتِ دارویی گونهٔ *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به فلوکونازول به‌عنوان مهم‌ترین داروی شایعِ موردمصرف در کاهش عوارضِ عفونت کاندیدیازیس می‌باشد. به همین منظور با توجه به ظهور روزافزونِ سویه‌های مقاوم به دارو، بررسیِ عواملِ مؤثر در بیان‌ژن‌های مقاومتِ دارویی موردتوجه قرار گرفته است. ازآنجایی‌که امروزه استفاده از داروهای مکمل و پیروی از پروتکل‌های طب مکمل دارای مقبولیت اجتماعی می‌باشد، در نتیجه استفاده از عواملی که بتواند جایگزینِ داروهای سینتیک شوند، اهمیت و جایگاه ویژه‌ای دارند. به همین منظور بررسیِ ترکیب‌های طبیعی موردمطالعه و ارزیابی قرار گرفته‌اند. در همین راستا، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی که از گذشته مورداستفاده قرار گرفته‌اند، با توجه به اثرهای جانبی بسیار کمتر نسبت به ترکیب‌های شیمیایی در بسیاری از تحقیق‌ها مطرح شده‌اند. یکی از رایج‌ترین ترکیبهای طبیعیِ زیستی، متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی مانند فنل‌ها هستند (۳۳). تیمول جزء اصلیِ ترکیب‌های فنلی در گیاه زِنیان است. تیمول دارای فعالیت ضدقارچی است و اثرهای متفاوتی بر خصوصیاتِ مورفولوژی و ژنتیک میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها دارد (۳۴). امروزه با پیشرفت علمِ نانو، برای حفاظتِ بیشتر از ترکیب‌ها و کنترل رهایشِ ترکیب‌های زیست‌فعال، از نانوحامل‌های لیپیدی به‌منظور انکپسوله کردن موادِ زیست‌فعال استفاده می‌شود که از انواع نانوحامل‌های لیپیدی می‌توان به لیپوزوم و نیوزوم اشاره نمود. نانولیپونیوزوم‌ها حامل‌های دارویی هستند که دارو را

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

درمقابل تخریب حفاظت می‌کنند و باعث افزایش راندمانِ اثرگذاری، کاهشِ میزانِ فراریت اسانس‌ها و کاهش اکسیدشوندگی می‌گردند (۳۵). در مطالعه‌های گسترده‌ای از نانولیپوزوم‌ها با ترکیب‌ها و فرمولاسیونِ متنوعی به‌عنوان حاملی برای داروها و ترکیب‌های مؤثر بر قارچ‌ها استفاده شده است، به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای اثربخشیِ ضدقارچی امیدوارکنندهٔ نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با روغن میخک و درخت چای بر روی *ترایکوفایتون روبروم*[۱] بررسی گردید (۳۶). در مطالعه‌ای دیگر نانولیپوزوم‌های حاوی فلوکونازول به‌طور قابل‌توجهی MIC را در برابرِ *آسپرژیلوس فلاووس*[۲] و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*[۳] کاهش دادند (۳۷). در مطالعه‌ای دیگر نانولیپوزوم‌های حاویِ وریکونازول[۴] بر فعالیت بیولوژیکی و بیان‌ژن‌های *ERG11*، *CDR1* و *CDR2* در *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول انجام شد و نشان داده شد که فرمولاسیونِ لیپوزومی وریکونازول می‌تواند بیان‌ژن‌های مقاوم به آزول را در مقایسه با فرم آزاد وریکونازول بیشتر کاهش دهد (۳۸). در مطالعاتی دیگر نشان داده شد که فعالیت ضدقارچی نیستاتینِ[۵] لیپوزومی در شرایط آزمایشگاهی و در برابر گونه‌های *آلبیکنس* مؤثرتر از نیستاتین آزاد می‌باشد (۳۹، ۴۰). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که اثرهای ضدقارچیِ اسانسِ آویشن به‌صورت فرمولاسیونِ نانونیوزومی نسبت به فرمِ آزاد به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است (۴۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، فعالیتِ ضدقارچیِ نیوزومِ حاوی کتوکونازول درمقابل *کاندیدا آلبیکانس*، MIC کمتری نسبت به داروی خالص داشته است (۴۲). به‌علاوه در مطالعه‌ای دیگر، فرمولاسیون نیوزومیِ کروسین در ترکیب با فلوکونازول اثربخشیِ قابل‌توجهی در برابر جدایه‌های حساس و مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد (۴۳). با توجه به مطالعه‌های انجام‌شده، فرمولاسیونِ لیپوزومی و نیوزومی نقش مؤثری در اثربخشی و حفظ ترکیب‌های ضدقارچی دارد و باتوجه به اینکه اطلاعات چندانی درخصوص اثرهای ضدقارچیِ نانوذرهٔ حاملِ تیمول بر گونه‌های کاندیدا موجود نمی‌باشد، طی مطالعهٔ اخیر، اثرهای نانوذره با فرمولاسیونی مبتنی‌بر لیپوزوم و نیوزوم با عنوان نانولیپونیوزوم، بر روی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* که مهم‌ترین عامل اتیولوژیک بیماریِ کاندیدیازیس با زمینه‌های مستعدکنندهٔ فیزیولوژیک و ایمونولوژیک فراوان است، موردبررسی قرار گرفت تا درصورت وجود اثرهای ضدکاندیدایی نانوذرهٔ ساخته‌شده، اثر این مواد بر روی سایر قارچ‌ها و همچنین امکان استفاده از آن در بیماری‌های قارچی، طی مطالعه‌های بعدی موردتوجه واقع گردد. در مطالعهٔ حاضر نیز اثرِ مهاریِ تیمول انکپسوله‌شده در نانولیپونیوزوم با کاهش میزانِ بیان‌ژن مقاومت *ERG11* باعث افزایشِ اثر ضدکاندیدایی داروی سنتزشده در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول گردید. بنابراین می‌توان فرض کرد که تیمولِ انکپسوله قادر است به طریقی مقاومت به فلوکونازول را کاهش دهد. با توجه به اینکه در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول کاهشِ بیان‌ژن‌های پمپ افلاکس به وفور مشاهده می‌شود، در این مطالعه فرض گردید که تیمولِ انکپسوله‌شده با اثر بر بیان‌ژن *ERG11* به‌عنوان یکی از ژن‌های مؤثر در انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها به خارجِ سلول، باعث اثربخشیِ آنتی‌بیوتیک می‌شود. با توجه به بررسیِ اپیدمیولوژیک که در نمونه‌های حاضر در این مطالعه که توسط گودرز قلعه و همکاران جداسازی‌شده بودند صورت گرفت، نتایج نشان می‌دهند که بیشترین میزانِ مقاومت به فلوکونازول و بیان‌ژن مقاومت *ERG11* در بانوانی مشاهده شده است که به یک بیماریِ مستعدکنندهٔ زمینه‌ای مانند مشکلات گوارشی، دیابت و آلزایمر مبتلا بوده‌اند (۲۰).

با توجه به نتایج این مطالعه، میزان بیان‌ژن در افرادی با مشخصات بیان‌شده افزایش چشمگیری داشته است (P.value ‹ ۰/۰۵) که این امر می‌تواند هشدار مهمی درخصوص افزایشِ دامنهٔ مقاومتِ دارویی این قارچ به داروهای روتینِ مورداستفاده باشد.

۵- نتیجه‌گیری

کاربرد داروهای گیاهی مانند زنیان به‌دلیل ارزان، بومی، دردسترس بودن، با تأثیر بسیار زیاد و مناسب می‌تواند اثر فزاینده‌ای در کاهش عوارضِ حضورِ قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مبتلایان به کاندیدیازیس داشته باشد. از طرفی ساخت این داروها به‌صورت انکپسوله‌شده (لیپونیوزوم) باعث رهایش دارو به‌میزان کمتری بر روی قارچ‌ها می‌شود، لذا در این شرایط دارو سمیّت کمتری بر بدن انسان خواهد داشت. به‌هرحال این زمینه نیاز به انجام پژوهش‌های گسترده‌تری

[۱] *Trichophyton rubrum*
[۲] *Aspergillus flavus*
[۳] *Aspergillus fumigatus*
[۴] Voriconazole
[۵] Nystatin

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

در شرایط *in-vitro* و *in-vivo* دارد تا در آینده بتواند به‌صورت یک داروی همه‌جانبه مورداستفاده قرار گیرد.

۶- ملاحظات اخلاقی

این مطالعه به‌صورت in-vitro روی ایزوله‌های بالینیِ *کاندیدا آلبیکنس* انجام شد. تمامیِ نمونه‌ها بدون اطلاعاتِ شناساییِ بیماران به دست آمد و استفاده از آن‌ها مطابق دستورالعمل‌های بیمارستان و آزمایشگاه انجام شد. آزمایش‌ها با رعایت استانداردهای ایمنیِ زیستی صورت گرفت و تأیید اخلاقیِ انسانی یا حیوانی برای مطالعه نیاز نبود.

۷- تشکر و قدردانی

از تمامیِ مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال خصوصاً دانشکدهٔ علوم‌زیستی که در انجام فعالیت‌ها و امور آزمایشگاهی این پژوهش، کمال همکاری و مساعدت را داشته‌اند سپاسگزاری می‌گردد.

۸- تعارض و منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافعی ندارند.

۹- سهم نویسندگان

محدثه لاری پور: طراحی، نظارت عملی، تحلیل و تفسیر داده‌ها
حورا دادگستر: جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل و تفسیر داده‌ها
محمدرضا رضوی: نظارت علمی و جمع‌آوری داده‌ها
زهرا گودرزقلعه مهدیخانی: اجرای بخش عملی

۱۰- کد اخلاق

IR.IAU.PS.REC.1398.211

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

۱۱- منابع

1.Yan Z-Z, Hu H-W, Xiong C, Peleg AY, Chen Q-L, Sáez-Sandino T, et al. Environmental microbiome, human fungal pathogens, and antimicrobial resistance. Trends in Microbiology. 2024.
2.Divyashree S, Shruthi B, Vanitha P, Sreenivasa M. Probiotics and their postbiotics for the control of opportunistic fungal pathogens: A review. Biotechnology Reports. 2023;38:e00800.
3.Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. Candida albicans—the virulence factors and clinical manifestations of infection. Journal of Fungi. 2021;7(2):79.
4.Tamo SB. Candida Infections: clinical features, diagnosis and treatment. Infect Dis Clin Microbiol. 2020;2(2):91-102.
5.Pristov K, Ghannoum M. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. Clinical Microbiology and Infection. 2019;25(7):792-8.
6.Washton H. Review of fluconazole: a new triazole antifungal agent. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1989;12(4):229-33.
7.Wang W-Y, Cai H-Q, Qu S-Y, Lin W-H, Liang C-C, Liu H, et al. Genomic variation-mediating fluconazole resistance in yeast. Biomolecules. 2022;12(6):845.
8.Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. Antibiotics. 2020;9(6):312.
9.Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(7):a019752.
10.Shi C, Liu J, Li W, Zhao Y, Meng L, Xiang M. Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23 clinical isolates of Candida albicans. Brazilian Journal of Microbiology. 2019;50:157-63.
11.Odiba AS, Durojaye OA, Ezeonu IM, Mgbeahuruike AC, Nwanguma BC. A new variant of mutational and polymorphic signatures in the ERG11 gene of fluconazole-resistant candida albicans. Infection and Drug Resistance. 2022:3111-33.
12.Paul S, Kannan I, Mohanram K. Extensive ERG11 mutations associated with fluconazole-resistant Candida albicans isolated from HIV-infected patients. Current medical mycology. 2019;5(3):1.
13.Wahab A-t-, Ilyas Q, Farooq S, Javaid S, Ahmed S, Rahman A-u-, et al. In-vitro and in-vivo anticandidal activity of Trachyspermum ammi (L.) sprague seeds ethanolic extract and thymol-containing hexanes fraction. Natural Product Research. 2021;35(22):4833-8.
14.Vitali LA, Beghelli D, Nya PCB, Bistoni O, Cappellacci L, Damiano S, et al. Diverse biological effects of the essential oil from Iranian Trachyspermum ammi. Arabian Journal of Chemistry. 2016;9(6):775-86.
15.Masoumipour F, Hassanshahian M, Jafarinasab T. Antimicrobial activity of combined extracts of trachyspermum, thymus and pistachio against some pathogenic bacteria. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2018;25(2):153-63.
16.Alonso MJ. Nanoparticulate drug carrier technology. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines: CRC Press; 2020. p. 203-42.
17.Jain KK. An overview of drug delivery systems. Drug delivery systems. 2020:1-54.
18.Maja L, Željko K, Mateja P. Sustainable technologies for liposome preparation. The journal of supercritical fluids. 2020;165:104984.
19.Arumugam K. Niosomes: A novel carrier drug delivery system. Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 2021;11(1).
20.Goodarz Ghaleh Mehdikhani Z, Larypoor M, Razavi MR. The epidemiologic pattern of candidiasis in people with predisposing backgrounds. medical journal of mashhad university of medical sciences. 2022;65(5).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

21.Liebowitz LD, Ashbee HR, Evans EGV, Chong Y, Mallatova N, Zaidi M, et al. A two year global evaluation of the susceptibility of Candida species to fluconazole by disk diffusion. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2001;40(1-2):27-33.
22.El Said M, Badawi H, Gamal D, Salem D, Dahroug H, El-Far A. Detection of ERG11 gene in fluconazole resistant urinary candida isolates. Egypt J Immunol. 2022;29(4):134-47.
23.Mohammadi M, Haghirosadat BF, larypoor M, Ehsani R, Yazdian F, Rashedi H, et al. Synthesis, characterization and evaluation of liponiosome containing ginger extract as a new strategy for potent antifungal formulation. Journal of Cluster Science. 2020;31:971-81.
24.Pivetta TP, Simões S, Araújo MM, Carvalho T, Arruda C, Marcato PD. Development of nanoparticles from natural lipids for topical delivery of thymol: Investigation of its anti-inflammatory properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018;164:281-90.
25.De Giani A, Sandionigi A, Zampolli J, Michelotti A, Tursi F, Labra M, et al. Effects of inulin-based prebiotics alone or in combination with probiotics on human gut microbiota and markers of immune system: a randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy subjects. Microorganisms. 2022;10(6):1256.
26.Alizadeh F, Khodavandi A, Zalakian S. Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of ERG11 gene in fluconazole-resistant Candida albicans. Current Medical Mycology. 2017;3(1):13.
27.Mohammed NA, Abdulbaqi NJ, Ajah HA. Epidemiological Study of Candida Species among Vaginal and Oral Candidiasis from different clinical states. International Journal of ChemTech Research. 2017;10(5):844-57.
28.Diba K, Chavoshin A, Hoseyni Jazani N, Badie P, Bonyadi F, Alizadeh H, et al. Identification and determination of drug resistant of Candida species isolated from hospital acquired infections. Armaghane Danesh. 2015;19(10):870-82.
29.Cowen LE. Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. FEMS microbiology letters. 2001;204(1):1-7.
30.Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Resistance to antifungal drugs. Infectious Disease Clinics. 2021;35(2):279-311.
31.Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in Candida dubliniensis isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(6):1695-703.
32.Nishimoto AT, Sharma C, Rogers PD. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus Candida albicans. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2020;75(2):257-70.
33.Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E. Antifungal activity of microbial secondary metabolites. PloS one. 2011;6(9):e25321.
34.Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food chemistry. 2016;210:402-14.
35.Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Naderinezhad S, Malaei-Balasi Z, Zandieh Doulabi B. New Approach for the Synthesis, Entrapment of Hydrophilic Drugs and Evaluation of Physico-Chemical Characteristics of PH-sensitive Nano-Liposome: Improving Therapeutic Efficacy of Doxorubicin in Order to Treatment Bone Tumor and Reducing the Side Effects of Doxorubicin. SSU_Journals. 2017;24(10):780-9.
36.Aguilar-Pérez KM, Medina DI, Parra-Saldívar R, Iqbal HM. Nano-size characterization and antifungal evaluation of essential oil molecules-loaded nanoliposomes. Molecules. 2022;27(17):5728.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]

37.Javed N, Ijaz S, Akhtar N, Khan HMS. Nanostructured Ethosomal gel loaded with Arctostaphylosuva-Ursi extract; in-vitro/in-vivo evaluation as a cosmeceutical product for skin rejuvenation. Current Drug Delivery. 2022;19(6):706-20.
38.Hassanpour P, Hamishehkar H, Bahari Baroughi B, Baradaran B, Sandoghchian Shotorbani S, Mohammadi M, et al. Antifungal effects of voriconazole-loaded nano-liposome on fluconazole-resistant clinical isolates of Candida albicans, biological activity and ERG11, CDR1, and CDR2 gene expression. ASSAY and Drug Development Technologies. 2021;19(7):453-62.
39.Asadi M, Toofani-Milani A, Soufiani KB. Nystatin Encapsulated Nanoliposomes: Potential Anti-infective against Candida Spp. Isolated from Candidiasis Patients. Advanced Biomedical Research. 2024;13(1):56.
40.Saadat E, Dinarvand R, Ebrahimnejad P. Encapsulation of nystatin in nanoliposomal formulation: characterization, stability study and antifungal activity against Candida albicans. Pharmaceutical and biomedical research. 2016;2(1):44-54.
41.Ebrahimpour M, Akhlaghi M, Hemati M, Ghazanfary S, Shahriary S, Ghalekohneh SJ, et al. In vitro evaluation and comparison of anticancer, antimicrobial, and antifungal properties of thyme niosomes containing essential oil. Nanomedicine Journal. 2022;9(4).
42.Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbari J, Moazeni M, Babaei A, Negarandeh R, et al. Preparation and in-vitro evaluation of ketoconazole-loaded niosome (ketosome) for drug delivery to cutaneous candidiasis. Pharmaceutical Sciences. 2022;29(2):208-18.
43.Norozipor S, Bamorovat M, Mosavi SAA, Salarkia E, Hadizadeh S, Sharifi F, et al. Synergistic activity of crocin and crocin loaded in niosomes alone and in combination with fluconazole against Candida albicans isolates: In vitro and in silico study. Journal of Medical Mycology. 2024;34(2):101478.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-28]