

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

Mohaddeseh Larypoor^{1*}, Hooria Dadgostar¹, Mohammad Reza Razavi², Zahra Goodarz Ghaleh Mehdikhani³

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. Antibigram 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 $63.8 \pm 1.92 \mu\text{m}$, 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 $\mu\text{g/mL}$, 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

بررسی اثر ضدقارچی نانولیپونیوزوم‌های بارگذاری شده با تیمول بر بیان ژن *ERG11* در جدایه‌های کاندیدا/آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول

محدثه لاری پور^{۱*}، حورا دادگستر^۱، محمدرضا رضوی^۲، زهرا گودرزقلعه مهدیخانی^۳

۱- دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- بخش انگل شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳- دانشکده علوم زیستی، 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 ضدقارچی لیپونیوزوم حامل تیمول را بر بیان ژن *ERG11* بررسی می‌کند. **مواد و روش‌ها:** مقاومت به فلوکونازول و وجود ژن *ERG11* با استفاده از روش PCR در جدایه‌های کاندیدا/آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های بالینی بررسی شد. تیمول خریداری و تهیه لیپونیوزوم حاوی تیمول به روش لایه نازک و آب انجام شد. سرعت انتشار، ظاهر، ساختار شیمیایی، اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای لیپونیوزوم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش آنتی‌بیوگرام انجام شد و اثر زیرحداقل غلظت مهارکننده (Sub-MIC) بر بیان ژن *ERG11* در جدایه‌های مقاوم با استفاده از روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: لیپوزوم‌ها با درصد به دام افتادن ۶۷/۲۲-۸۶/۵، قطر $1/92 \pm 8/63$ میکرومتر، اندازه 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 جدایه منتخب مقاوم ۹، ۱ و ۱۰ به ترتیب ۲/۱۵۶، ۲/۱۵۶ و ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کاهش بیان ژن *ERG11* در آن‌ها نسبت به گروه غیرتیمار به ترتیب ۱/۲۳، ۱/۰۴ و ۱/۱۷ برابر گزارش شد. **نتیجه‌گیری:** نانولیپونیوزوم‌های تیمول را می‌توان ترکیبی مؤثر در کاهش مقاومت فلوکونازول در نظر گرفت، البته به تحقیقات گسترده‌تری در شرایط *in-vitro* و *in-vivo* نیاز می‌باشد.

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

*نویسنده مسئول: محدثه لاری پور؛ دانشیار گروه میکروبیولوژی،

دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران؛

پست الکترونیکی: m.larypoor@iaui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰

۱- مقدمه

مقاومت ضد میکروبی، یکی از ده تهدید اصلی سلامت عمومی است و علاوه بر از دست دادن جان میلیون ها نفر، سالانه منجر به هزینه های اجتماعی و اقتصادی قابل توجهی نیز می شود. بانک جهانی تخمین می زند که مقاومت ضد میکروبی تا سال ۲۰۵۰ منجر به ۱ تریلیون دلار هزینه اضافی در مراقبت های بهداشتی خواهد شد (۱) و با توجه به افزایش روزافزون سرانه مصرف عوامل ضد میکروبی و ظهور پاتوژن های مقاوم، بررسی عوامل مؤثر در کاهش مقاومت ضد میکروبی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مطالعه های گسترده ای پیرامون پاتوژن های مقاوم و عوامل مؤثر بر آن ها انجام شده است. از پاتوژن های مقاوم می توان به گونه های مختلف قارچی اشاره نمود که به عنوان عوامل تهدیدکنندگی برای سلامت مورد توجه هستند، گونه های کاندیدا^۱ از جمله این قارچ ها می باشند که می توانند مشکلات عدیده ای را در درمان، تشخیص و مراقبت های بهداشتی ایجاد کنند و در بسیاری از موارد نیز عامل مرگ و میر و عوارض قابل توجهی باشند (۲). ارتباط بین گونه های کاندیدا و میزبان آن ها به تعداد میکروارگانیسم، قدرت بیماری زایی گونه ها و مقاومت میزبان بستگی دارد. قارچ کاندیدا/آلبیکنس^۲ شایع ترین گونه در این جنس می باشد و به عنوان فلور نرمال در حفره دهانی، لوله گوارش و واژن در بدن محسوب می شود (۲، ۳). کاندیدا/آلبیکنس قدرت بیماری زایی قابل توجهی دارد و می تواند اندام های مختلفی را هدف قرار داده و انواع مختلف عفونت های بالینی کاندیدیازیس^۳ را سبب شود (۳، ۴). امروزه انواع سویه های مقاوم این قارچ در انواع اشکال بالینی ظاهر شده است و اغلب این سویه ها به عوامل ضد میکروبی بالخص آزول ها مقاوم هستند (۵، ۶). از جمله داروهای آزول که مقاومت به آن منجر به نگرانی شده است، می توان به فلوکونازول^۴ اشاره نمود. فلوکونازول یک عامل ضد قارچ با طیف وسیع می باشد. فلوکونازول در مقایسه با دیگر آزول ها اثر اختصاصی تری بر روی آنزیم سیتوکروم P450^۵ قارچی نسبت به نوع انسانی داشته و دارای عوارض و تداخل های کمتری نیز می باشد. همچنین فلوکونازول با اثر بر روی آنزیم ۱۴-

آلفامیتیلاز (Erg11p) ^۶ که توسط ژن *ERG11* (ژن شماره ۱۱ در مسیر بیوسنتز ارگوسترول) سنتز می شود و در تبدیل لانسترول^۷ به ۱۴-دمتیل لانسترول^۸ دخالت دارد، باعث مهار اثرگذاری آنزیم و کاهش سطح ارگوسترول می شود (۶، ۷). هنگامی که Erg11p مهار می شود، سایر آنزیم های موجود در مسیر (Erg6p, Erg25p, Erg26p, Erg27p و Erg3p) یک استرول سمی ضد قارچی به نام ۱۴-آلفامیتیل ارگوستا-۲۴(۲۸)دینول^۹ را سنتز می کنند. علاوه بر این، آزول ها مسئول افزایش سطح گونه های فعال اکسیژن هستند و بدین ترتیب رشد قارچ ها را مهار می کنند (۸).

به منظور بررسی عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت، مطالعه های گسترده ای انجام شده و انواع مختلفی از مکانیسم های مولکولی در پیدایش فنوتیپ مقاومت دارویی در سلول های یوکاریوت قارچی شناسایی شده است. از جمله این مکانیسم ها می توان به کاهش انتقال دارو به داخل سلول، تجزیه ارگوسترول^{۱۰} در مسیر بیوسنتزی آن، افزایش سطوح هدف سلولی داروهای آزولی و افزایش انتشار دارو از سلول توسط پمپ های افلاکس غشایی اشاره نمود (۸، ۹). به دنبال مطالعه های ژنتیکی، انواعی از ژن هایی که در ایجاد مقاومت دارویی نقش دارند شناسایی شدند، بیان بیش از حد ناقل های غشایی مانند ناقل های کاست متصل شونده به ATP (ABC-T)^{۱۱} و ناقل های تسهیل کننده اصلی (MFS-) ^{۱۲} T، که توسط ژن های *CaCDR1*, *CaCDR2* و *CaMDR1* تنظیم می شوند با مقاومت به آزول ها از جمله فلوکونازول مرتبط می باشد (۸، ۱۰، ۱۱). همچنین بیان بیش از حد *ERG11* با مقاومت آزول در بسیاری از قارچ ها مرتبط است. چندین جهش نقطه ای در *ERG11* در ایزوله های بالینی مقاوم شناسایی شده است. علاوه بر *ERG11*, *ERG3* و *ERG6* نیز با مقاومت به آزول و تشکیل ترکیب های سمی مرتبط هستند. از طرفی دیگر Upc2p یک فاکتور رونویسی است که اکثر ژن های بیوسنتز ارگوسترول را تنظیم می کند و جهش در ژن سنتزکننده آن *(CaUPC2)* از جمله عوامل مرتبط با مقاومت به آزول ها

^۸ 14-Demethyl lanosterol

^۹ 14 α methyl ergosta 8-24 (28) dieneol

^{۱۰} Ergosterol

^{۱۱} (ATP)-Binding Cassette Transporters (ABC-T)

^{۱۲} Major Facilitator Superfamily Transporters (MFS-T)

^۱ *Candida species*

^۲ *Candida albicans*

^۳ Candidiasis

^۴ Fluconazole

^۵ Cytochrome P450

^۶ 14 - α demethylase (Erg11p)

^۷ Lanosterol

می باشد (۸، ۱۰). در بررسی های انجام شده در تعدادی از ایزوله های بالینی *آلبیکنس* مقاوم به آزول ها، بیان بیش از اندازه در ژن *ERG11* مشاهده شده است. همچنین دیده شده است که حذف این ژن در *آلبیکنس* حساسیت آزولی این مخمر را افزایش می دهد. مطالعه های انجام شده، نقش ژن *ERG11* در مقاومت به آزول ها خصوصاً فلوکونازول را اثبات کرده اند (۱۱، ۱۲). از دیرباز مواد طبیعی مؤثر در پیشگیری و درمان عفونت ها مانند ترکیب های گیاهی مورد توجه بشر بوده اند. امروزه نیز با توجه به نیاز به کشف ترکیب های ضد میکروبی، محققان به بررسی اثر ضد میکروبی این ترکیب ها مخصوصاً اسانس های گیاهی می پردازند. از جمله این گیاهان، می توان به گیاه زنیان اشاره نمود. گیاه زنیان^۱ متعلق به خانواده چتریان است که به صورت خودرو رشد می کند (۱۳). این گیاه از ترکیب ها و اجزای گوناگونی مانند فیبر، کربوهیدرات، ساپونین، چربی، پروتئین، گلیکوزید، تانن، کلسیم، آهن، ید، منگنز، کبالت، مس، فسفر، تیامین و ریبوفالوین تشکیل شده است. میوه این گیاه شامل ۲-۹ درصد روغن قهوه ای رنگی است که به آن روغن اجوان^۲ گفته می شود و جزء اصلی این روغن، تیمول^۳ (۳۵-۶۱ درصد) می باشد. اجزای غیر تیمولی تشکیل دهنده همچنین شامل پاراسایمن، گاما ترپینن، آلفا پینن، بتا پینن، آلفا ترپینن، استایرن، دلتا ۳ کارن، آلفا فالندرن و بتا فالندرن می باشند (۱۴). تیمول جزء اصلی اسانس گیاه زنیان است که یک ترکیب فنل مونوترپنئیدی و ایزومر کارواکرول است. تیمول دارای چندین خاصیت بیولوژیکی ضد قارچ، ضد اسپاسم، ضد سرطان، ضد انعقاد، ضد التهاب، ضد میکروب و آنتی اکسیدان می باشد (۱۴، ۱۵). با توجه به ماهیت حساس اسانس های گیاهی و افزایش روزافزون علم و فناوری استفاده از حامل های دارو و انجام فرایند انکپسولاسیون برای این ترکیب ها بسیار مطرح می باشد. فرایند انکپسولاسیون^۴ تکنیکی بسیار مؤثر برای کنترل رهایش و حفظ ترکیب های حساس محسوب می شود (۱۶). تکنولوژی های مختلفی برای انکپسوله کردن وجود دارند که می توان از آن ها در

صنایع غذایی و دارویی بهره جست. از جمله حامل هایی که براساس این تکنولوژی ها به دست می آیند، می توان به میسل های سورفاکتانت^۵، نانوسفرها^۶، نانوذرات^۷، نانوکولئاتها^۸، لیپوزومها^۹ و نانونیوسومها^{۱۰} اشاره نمود (۱۷، ۱۸). از این میان لیپوزومها و نیوزومها در مطالعه های مختلفی به عنوان حامل دارو مورد بررسی قرار گرفته اند. لیپوزومها، وزیکول های بسیار کوچکی هستند که از یک حفره مرکزی محتوی آب یا محلول آبی و یا یک یا چند لایه فسفولیپیدی تشکیل شده اند، بنابراین قادرند گستره وسیعی از داروها را در خود محبوس نمایند (۱۶-۱۸). نیوزومها، وزیکول های سورفاکتانت غیریونی هستند که در اثر هیدراتاسیون سورفاکتانت غیریونی مرکب یا بدون اختلاط کلسترول و دیگر چربی ها تشکیل می گردند (۱۶، ۱۹). نیوزومها از نظر عملکردی مشابه لیپوزومها می باشند، به طوری که هر دو می توانند در سیستم های دارورسانی هدفمند و کنترل شده به کار روند، فراهمی زیستی را افزایش داده و میزان پاک سازی حذفی دارو را کاهش دهند. ویژگی های هر دو ساختار یاد شده، به ترکیب دو لایه و روش تهیه آن ها بستگی دارد (۱۸، ۱۹). در این راستا، این مطالعه با هدف بررسی اثرهای ضد قارچی لیپونیوزوم های حاوی تیمول بر بیان ژن *ERG11* در گونه های *آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول که توسط گودرز قلعه مهدیخانی و همکاران از نمونه های بالینی جداسازی شده بودند انجام شده است (۲۰).

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه و نگهداری مخمرها

تعداد ۱۲۶ ایزوله بالینی قارچ *آلبیکنس* در مطالعه ای 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- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۲۰). جدایه ها و سویه استاندارد *آلبیکنس* ATCC5027 تهیه شد و پس از احیاء، در محیط

⁶ Nanospheres

⁷ Nanoparticles

⁸ Nanocochleates

⁹ Liposomes

¹⁰ Nanoniosomes

¹ Trachyspermum

² Ajwain oil

³ Thymol

⁴ Encapsulation

⁵ Surfactant micelles

سایکلر، آلمان) انجام گرفت. در نهایت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز و ژل داک (Bio-Rad Sub-Cell GT, آمریکا) بررسی گردید.

۲-۴- سنتز لیپونیزوم با بارگذاری تیمول به روش آب پوشان لایه نازک

سنتز نانولیپونیزوم به روش آب پوشان لایه نازک انجام شد. مقدار کل فاز چربی تشکیل دهنده لیپونیزوم ها ۳۱۱ میکرومول در نظر گرفته شد که ۶۱ درصد مولی این مجموعه متشکل از اسپن ۴۱، توپین ۴۱ و لسیتین با مقادیر مساوی و ۴۱ درصد مولی کلسترول (سیگما، آلمان) در نظر گرفته شد. در این روش، ابتدا اجزای تشکیل دهنده شامل سورفکتانت های غیریونی لسیتین، کلسترول و تیمول (سیگما، آلمان) به مقدار ۱/۴ میلی گرم در میلی لیتر فرمولاسیون نهایی، از محلول های استوک برداشته و به بالن ته گرد ۱۵ میلی لیتری منتقل و بالن به دستگاه روتاری (Heidolph, آلمان) متصل شد. دمای بن ماری دستگاه، روی عدد ۷۱ درجه سانتی گراد و سرعت چرخش بالن روی عدد ۱۸۱ دور بر دقیقه تنظیم گردید و عمل تبخیر به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در ادامه فیلم نازکی از اجزای فاز چربی بر روی دیواره داخلی بالن ایجاد شد و به مدت ۲۴ ساعت تا خشک شدن کامل در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. جهت هیدراته نمودن فیلم چربی و تشکیل لیپونیزوم، ۵ سی سی آب دیونیزه (۷۱ درجه سانتی گراد) به بالن اضافه گردید و سپس با استفاده از دستگاه روتاری به مدت ۳۱ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با سرعت چرخش ۱۱۱ دور بر دقیقه عمل تبخیر انجام شد. برای تکمیل مرحله هیدراتاسیون، فرمولاسیون ها در ویال های شیشه ای از نوع بوروسیلیکات به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند و سپس برای نگهداری طولانی مدت تر به یخچال منتقل شدند (۲۳).

۲-۵- رهايش تیمول از نمونه های لیپونیزومی

برای بررسی آزادسازی دارو از سل انتشار مدل Franz که از جنس شیشه بود استفاده شد (۲۴). در بخش گیرنده از آب و اتانول ۵۱/۵۱ درصد حجمی استفاده گردید. مقدار یک میلی لیتر از سوسپانسیون لیپونیزوم حاوی دارو به آرامی در سطح غشای سلولز استات در بخش دهنده پخش شد.

پوتیتو دیکستروز آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند.

۲-۲- ارزیابی حساسیت دارویی

ارزیابی حساسیت دارویی به فلوکونازول به روش دیسک دیفیوژن و براساس استاندارد CISI 2022 انجام شد. به این ترتیب که در ابتدا استاندارد ۰/۵ مک فارلند با استفاده از محلول ۱ درصد اسید سولفوریک و محلول آبی ۱/۱۷۵ درصد کلریدباریم آماده سازی شد. برای ارزیابی حساسیت دارویی، نمونه استاندارد و ۲۵۱ ایزوله بالینی کاندیدا/آلبیکنس، سوسپانسیون سلولی براساس نیم مک فارلند به تعداد ۱×۱۱ سلول در یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) حاوی مکمل های گلوکز به میزان ۲ درصد و متیلن بلو به میزان ۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر با سوپ استریل به صورت چمنی کشت داده شد، سپس دیسک های ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول بعد از ۱۵ دقیقه در مرکز هریک از پلیت ها قرار داده شد و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند (۲۱).

۲-۳- بررسی حضور ژن ERG11 در جدایه های کاندیدا

آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول با روش PCR

بعد از تأیید بیوشیمیایی سویه های مقاوم، استخراج DNA جدایه ها با استفاده از کیت مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران صورت گرفت. تعیین غلظت محصول استخراج 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 استفاده شده شامل پرایمر رفت: 5'-TTTGGTGGTGGTAGACATA-3' و پرایمر برگشت: 5'-GAAGTATAATCAGGGTCAGG-3' می باشند (۲۲). توالی پرایمرها به شرکت Bioneer کره برای سنتز ارسال شد. واکنش به صورت ۳۵ سیکل شامل مراحل دناتوراسیون (۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد)، اتصال (۳۰ ثانیه در ۴۳ درجه سانتی گراد) و طولیل سازی (۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد) در ترموسایکلر^۲ (آپندورف مستر

^۲ Thermal Cycler

^۱ Polymerase chain reaction

مربوطه، تهیه و جذب‌ها ۵ بار خوانش شده و میانگین آن‌ها برای رسم نمودار استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

۸-۲- تعیین درصد محبوس‌سازی تیمول

برای تعیین مقدار تیمول بارگیری‌شده در لیپونیوزوم، ابتدا یک سی‌سی از سوسپانسیون لیپونیوزومی داخل یک میکروتیوب ریخته شد و به مدت ۳۱ تا ۴۵ دقیقه در سرعت ۱۴۱۱۱ دور بر دقیقه سانتریفیوژ (Hettich Rotanta، آلمان) شد. سپس حدود ۵۱۱ میکرولیتر فاز بالایی از محلول رویی جداسازی گردید. در ادامه حدود ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل اضافه شد تا فاز پایینی که حاوی سهم عمده‌ای از دارو و پلت است شفاف شود. برای تعیین مقدار تیمول نمونه‌های حاصل براساس جذب نوری از دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۴۸۱ نانومتر استفاده شد. پس از تبدیل جذب به غلظت توسط منحنی استاندارد تیمول و اعمال ضریب رقت ناشی از افزودن ایزوپروپیل الکل، درصد محبوس‌سازی با نسبت غلظت دارو در پلت به کل غلظت تیمول در لیپونیوزوم محاسبه شد.

۹-۲- بررسی توزیع اندازه ذره‌ای لیپونیوزوم‌ها

به منظور بررسی اندازه ذرات لیپونیوزومی از دستگاه مالورن با لنز ۱۱۱ و سرعت چرخش ۱۹۱۱ دور در دقیقه استفاده گردید. اندازه ذره‌ای هر فرمولاسیون با استفاده از این روش سه مرتبه تعیین شد.

۱۰-۲- آنتی‌بیوگرام

تست آنتی‌بیوگرام براساس پروتکل مرجع CLSI 2022 انجام شد. هدف از انجام این آزمایش، تعیین MIC قارچ کاندیدا/آلبیکنس و حداقل غلظت کشندگی قارچ^۴ (MFC) کاندیدا/آلبیکنس تیمول و نانولیپونیوزوم تیمول مورد بررسی بود. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از تهیه رقت سریالی در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. برای این تست از محیط کشت سابورو دکستروز براث (به عنوان کنترل محیط کشت)، استوک تیمول یا نانوذره به همراه سوسپانسیون استاندارد نیم مک‌فارلند کاندیدا/آلبیکنس (به عنوان کنترل دارو)، استوک کاندیدا/آلبیکنس (به عنوان

محیط بخش گیرنده توسط مگنت استیر با دور متوسط برای توزیع یکنواخت غلظت داروی آزاد فاز 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 نمونه برداری با رعایت جایگزینی ۱ میلی‌لیتر فاز گیرنده انجام گرفت. برای تعیین مقدار تیمول نمونه‌های حاصل، جذب 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^۱ SEM (JEOL JSM-7001FA، ژاپن) با ولتاژ شتاب‌دهی ۵ تا ۱۵ کیلوولت بررسی گردید. برای جلوگیری از باردار شدن و تخریب وزیکول‌ها، وزیکول‌ها با لایه ۱۱ نانومتری از طلا توسط Sputter Coater Coxem پوشانده شدند. برای بررسی ساختار شیمیایی نانوذرات لیپونیوزوم حامل تیمول از روش طیف‌سنجی تبدیلی مادون قرمز^۲ (FTIR) استفاده شد. برای این کار، نانوذره لیپونیوزوم حامل تیمول با پودر پتاسیم بروماید مخلوط شده و سپس به کمک دستگاه پرس به شکل قرص درآمد؛ قرص حاصله در داخل سل دستگاه قرار گرفت و طیف FTIR توسط دستگاه FTIR (Bruker Tensor 27، آلمان) آن ثبت شد. به منظور تعیین اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا از دستگاه تفرق نور پویا^۳ DLS1 (Malvern Zetasizer Nano ZS، بریتانیا) استفاده شد.

۲-۷- رسم طیف جذبی تیمول

تیمول (سیگما، آلمان) خریداری شد و به منظور تأیید، طیف جذبی بررسی و رسم گردید. به منظور رسم طیف جذبی، غلظت ۱۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تیمول در اتانول ۹۶ درصد تهیه و سپس با استفاده از آب دیونیزه محلول به میزان دو برابر رقیق و طیف جذبی در محدوده ۲۱۱ تا ۷۱۱ نانومتر با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies، آمریکا) رسم گردید. همچنین برای رسم نمودار استاندارد تیمول، غلظت‌های متفاوت از تیمول در حلال

³ Dynamic light scattering

⁴ Minimum fungicidal concentration

¹ Scanning Electron Microscope

² Fourier-transform infrared spectroscopy

دنا تراسیون (۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد)، اتصال (۲۵ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی گراد) و طولی سازی (۲۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد) در دستگاه Q-ROTORGENE (Qiagen, آلمان) انجام گرفت (۲۶).

۱۲-۲- روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده ها

از نرم افزار SPSS (Ver.24) برای تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده استفاده شد.

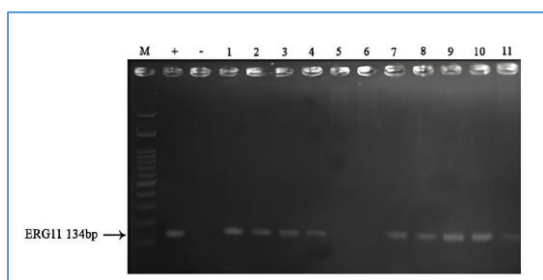
۳- نتایج

۱-۳- نتایج تست بررسی حساسیت دارویی

قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شده و براساس جدول CLSI 2022 جدایه های مقاوم شناسایی شدند. از میان ۱۲۶ جدایه بالینی کاندیدا/آلبیکس، در مجموع ۱۱ جدایه بالینی کاندیدا/آلبیکس مقاوم به داروی فلوکونازول شناسایی گردید. به منظور سهولت در انجام مراحل بعدی، جدایه های بالینی کاندیدا/آلبیکس مقاوم به داروی فلوکونازول، مجدداً از ۱ تا ۱۱ شماره گذاری شدند.

۲-۳- بررسی حضور ژن ERG11

در ادامه ۱۱ جدایه کاندیدا/آلبیکس مقاوم به فلوکونازول نسبت به حضور ژن ERG11 به روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند و از این تعداد، ۹ جدایه کاندیدا/آلبیکس دارای ژن ERG11 بوده و به عنوان جدایه مقاوم به فلوکونازول گزارش شدند. نتایج ژل داک محصولات PCR در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- باند DNA از قارچ کاندیدا/آلبیکس (M: نشانگر DNA ۱۳۴ جفت باز، +: کنترل مثبت، -: کنترل منفی، ۱-۱۱: بیان ژن ERG11 در کاندیدا/آلبیکس در جدایه های مقاوم به فلوکونازول)

کنترل مثبت) استوک قارچ به همراه آمفوتریسین B^۱ (به عنوان کنترل منفی)، استوک تیمول یا نانوذره و جدایه های قارچی استفاده شد. سپس پلیت ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. این آزمون برای هر جدایه قارچی با دوبار تکرار انجام شد. با توجه به عدم حلالیت در آب برای ساخت استوک تیمول و نانوذره، از اتانول ۷۱ درصد به عنوان حلال استفاده گردید. همچنین برای ساخت استوک آمفوتریسین B، از محیط کشت سابورو دیکستروز براث استفاده شد.

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ، از چاهک هایی با غلظت بالاتر از MIC، حدود ۱۱ میکرولیتر بر روی محیط پوتیتو دیکستروز آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید (۲۵).

۱۱-۲- بررسی میزان بیان ژن ERG11 با روش Real-Time PCR

استخراج RNA سوبه های کاندیدا/آلبیکس مقاوم به فلوکونازول طبق دستورالعمل کیت Sina Pure RNA (سیناکلون-ایران) انجام شد. بررسی غلظت و خلوص RNA با خوانش میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه نانودراپ و کیفیت تخلیص با استفاده از تکنیک الکتروفورز انجام شد. نتیجه ژل با استفاده از دستگاه ژل داک بررسی و عکس برداری شد. سنتز cDNA، طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (سیناکلون-ایران) انجام گرفت. محصول واکنش برای یک هفته در دمای ۲۱- درجه سانتی گراد نگهداری شد. ژن ACT به عنوان کنترل داخلی برای بررسی بیان ژن استفاده گردید. بهینه سازی شرایط تکثیر با غلظت های مختلف یون منیزیم انجام شد. مواد واکنش PCR از شرکت سیناکلون تهیه شده و پرایمرهای مورد استفاده 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'

می باشند. توالی پرایمرها به شرکت Bioneer کره برای سنتز ارسال شدند. واکنش به صورت ۴۱ سیکل شامل مراحل

¹ Amphotericin B

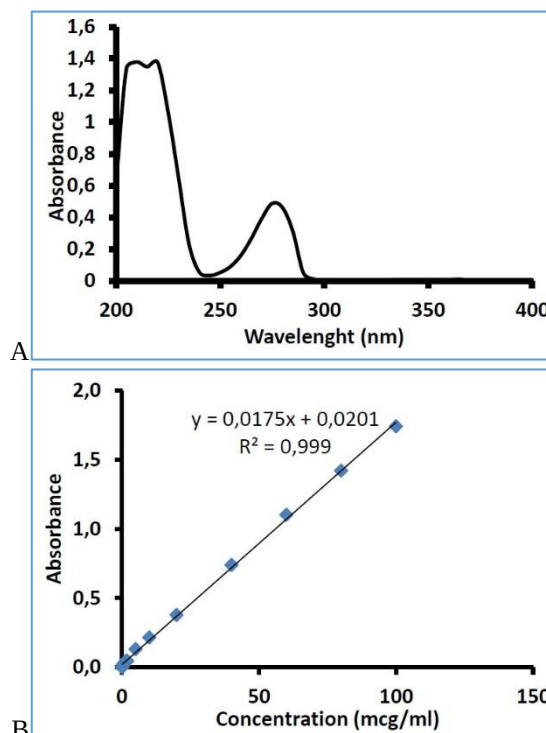
بوده و دارای سطحی صاف و هموار است و از ویژگی‌های ظاهری مطلوبی برخوردار می‌باشد.

جهت بررسی انکپسوله شدن تیمول در داخل نانوحامل لیپونیوزوم، طیف FTIR تیمول خالص و نانولیپونیوزوم حامل تیمول در محدوده اعداد موجی 500 cm^{-1} تا 3500 cm^{-1} رسم گردید. نتایج FTIR تیمول خالص در شکل ۴B آورده شده است. باند در 3227 cm^{-1} به ارتعاش کششی O-H فنولی اختصاص می‌یابد و ارتعاش خمشی در 1622 cm^{-1} مشاهده می‌شود. ارتعاش کششی C=C حلقه آروماتیک در 1585 cm^{-1} مربوط به ساختار بنزن آروماتیک است. ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن C-H به ترتیب در 2867 cm^{-1} و $2960-2900\text{ cm}^{-1}$ قرار گرفته است. در 1517 cm^{-1} ارتعاش کششی باند دوگانه C=C به چشم می‌خورد. همچنین باندهای اورتون در محدوده $1800-2100\text{ cm}^{-1}$ دیده می‌شوند. ارتعاش‌های خمشی در صفحه و خمشی خارج از صفحه C-H به ترتیب در 1300 cm^{-1} و 1035 cm^{-1} مشاهده می‌شود. طیف FTIR مربوط به نانولیپونیوزوم حامل تیمول در شکل ۴C آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، باندهای مربوط به تیمول حذف شده‌اند؛ ارتعاش‌ها با شدت بالا در ساختار لیپیدی نانوحامل در 344 cm^{-1} ، 1643 cm^{-1} و 1044 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاش کششی O-H، ارتعاش خمشی O-H (که با ارتعاش C=C ساختار لیپیدی هم‌پوشانی داشته است) و ارتعاش کششی C-O مربوط است. در نهایت نتایج به دست آمده قرارگیری تیمول در ساختار نانوحامل را تأیید نمود.

داده‌های به دست آمده از دستگاه DLS مطابق شکل ۴D گزارش شد. اندازه نانولیپونیوزوم حامل تیمول 185 nm و میزان شاخص پراکندگی ذرات (PDI) $1/195$ نشان داده شده است. همچنین میزان شارژ سطحی (پتانسیل زتا) برای نانولیپونیوزوم‌های حامل تیمول $-41/7\text{ mV}$ می‌باشد که با توجه به این مقدار شارژ سطحی آنیونی است. پتانسیل زتا برای نانولیپونیوزوم‌های حاوی تیمول در شکل ۴E آمده است.

۳-۳- طیف جذبی تیمول و نمودار استاندارد

نمودار استاندارد تیمول در شکل ۲B نشان داده شده است. محلول تیمول در محدوده مرئی هیچ جذبی نداشت و نتیجه در بازه ۲۱۱ تا ۴۱۱ نانومتر در شکل ۲A مشاهده شد.



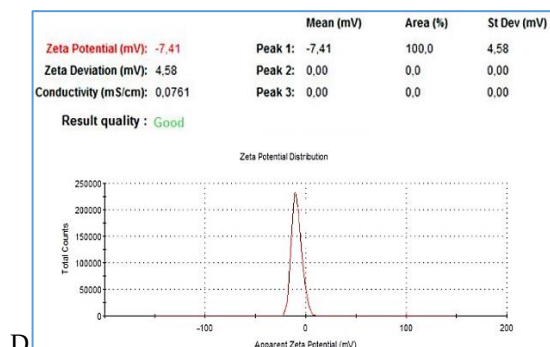
شکل ۲- (A) طیف جذبی تیمول، (B) نمودار استاندارد تیمول

۳-۴- رهایش تیمول از نمونه‌های لیپونیوزومی

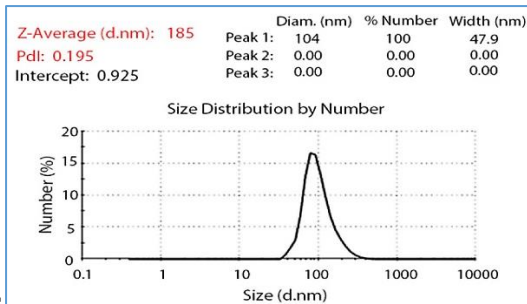
میزان رهایش تیمول در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۷۱ ساعت محاسبه گردید. پروفایل آزادسازی تیمول در شکل ۴A به شکل میانگین $\pm$ انحراف استاندارد مشاهده می‌شود. همان‌گونه که در نمودار مشاهده می‌شود، نمودار دارای دو فاز نمای است که در فاز اول، شیب غلظت ایجاد شده بین تیمول درون لیپونیوزوم و بافر، یک رهایش نسبتاً سریع را نشان داد و در فاز دوم، شیب 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 رهایش آهسته‌تر دارو میزان رهایش ثابت می‌شود.

۳-۵- شکل ظاهری و عملکردی لیپونیوزوم

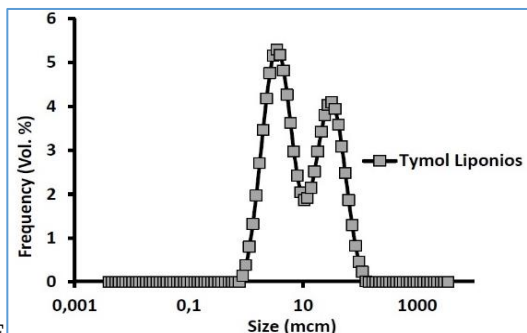
شکل ظاهری لیپونیوزوم نهایی در شکل ۳ قابل مشاهده می‌باشد و نشان می‌دهد که فرم نانوحامل، وزیکولی و کروی



D



E

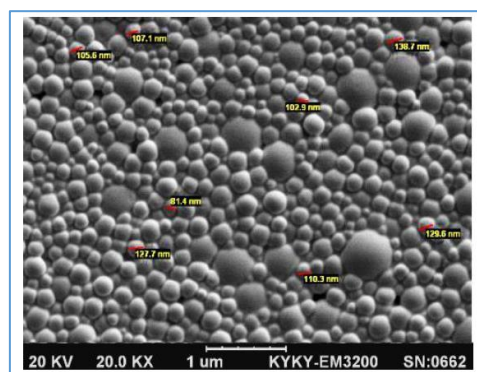


F

شکل ۴- A. نمودار رهایش تیمول از نانولیپونیوزوم، B. طیف FTIR تیمول، C. طیف FTIR نانولیپونیوزوم حاوی تیمول، D. پتانسیل زتا تیمول، E. اندازه و شاخص پراکندگی برای نانولیپونیوزومهای حامل تیمول، F. توزیع اندازه ذره‌ای برای نانولیپونیوزومهای حامل تیمول، Z-Average (zeta average): قطر متوسط نانوذره برحسب لیمونیوزومها، PDI: شاخص پراکندگی نانوذره، Zeta Potential: پتانسیل زتا شاخصی از میزان دفع بار بین ذرات با بار مشابه در فرمولاسیون

۳-۸- آنتی بیوگرام

حداقل غلظت بازدارندگی رشد قابل مشاهده تیمول مورد بررسی بر روی ۹ جدایه مقاوم، چهار جدایه حساس و یک جدایه استاندارد انجام شد، جدایه ۱، ۹ و ۱۱ با توجه به قوی بودن باندهای PCR برای انجام MIC انتخاب شدند و از جدایه شماره ۴ به عنوان جدایه حساس استفاده گردید. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانولیپونیوزوم حامل تیمول برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در جدول ۱ مشخص شده است. داده‌های به دست آمده وارد نرم افزار SPSS (Ver.24) شده و ارزش P و یا سطح معنی داری برای مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی تیمول



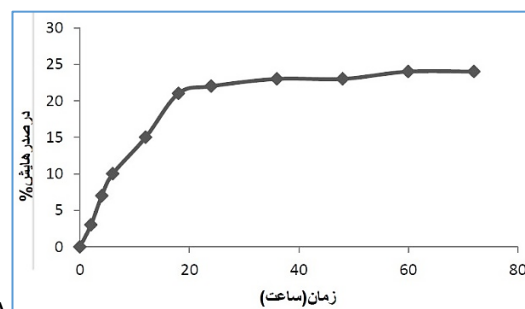
شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانولیپونیوزوم حامل تیمول

۳-۶- درصد محبوس سازی تیمول

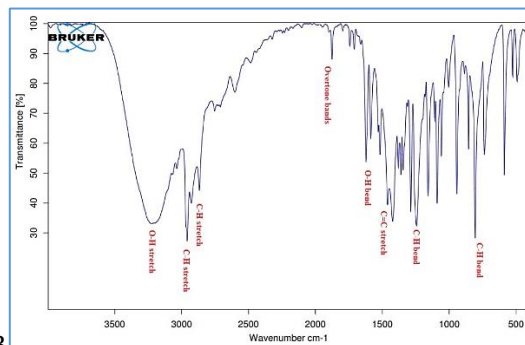
درصد محبوس سازی براساس فرمول بیان شده، معادل ۶۷/۳۲ درصد محاسبه گردید.

۳-۷- توزیع اندازه ذره‌ای لیپونیوزومها

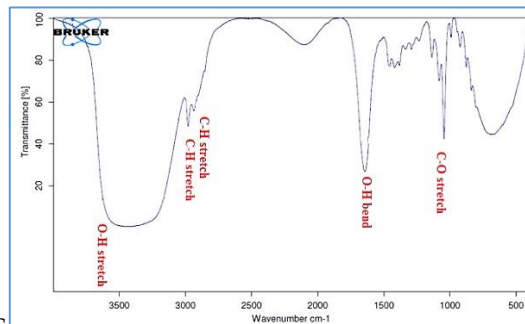
نمودار توزیع اندازه ذره‌ای لیپونیوزومها، قبل از سونیکاسیون در شکل ۴F نشان داده شده است. قطر میانگین حجمی لیپونیوزومها برابر با 104 ± 47.9 میکرومتر محاسبه گردید.



A



B



C

که تحت تیمار قرار گرفته بودند در مقایسه با سویه‌ای که تحت تیمار قرار نگرفته است، افزایش CT را نشان دادند، مقایسه میزان CT در نمونه تحت تیمار نانوذره و نمونه غیرتیمار در جدول ۲ آورده شده است. سپس میزان Fold change ژن موردنظر در نمونه تیمار شده نسبت به نمونه غیرتیمار محاسبه گردید که این مقدار در نمونه ۱ با غلظت ۷۸/۲ برابر با ۱/۱۴ و در نمونه ۱۰ با غلظت ۱۹/۵ برابر با ۱/۱۷ و میزان p-value به ترتیب برابر ۱/۱۳۱، ۱/۲۹۵ و ۱/۱۱۶ بوده است. به بیان دیگر پس از تیمار با نانوذره موردنظر، بیان این ژن نسبت به نمونه غیرتیمار به ترتیب ۱/۲۳، ۱/۰۴، ۱/۱۷ کاهش یافت. نتایج نمودارهای بیان ژن *ERG11* در نمونه‌های ۱، ۹ و ۱۰ به ترتیب در شکل ۵B، ۵C و ۵D آورده شده است.

جدول ۲- مقایسه میزان CT در نمونه تحت تیمار نانوذره و نمونه غیرتیمار

نمونه	غیر تیمار	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

۱۱-۳- آنالیز آماری ژن *ERG11*

آنالیز آماری ژن *ERG11* در جدایه‌های ۱، ۹ و ۱۰ انجام شد. نتایج آنالیز آماری سه جدایه به ترتیب در جدول ۳ آورده شده است. جدول بیانگر نتیجه T-Test برای داده‌های موردبررسی می‌باشد. در ستون p-value سطح معنی‌داری برای هر ژن مشخص شده است. سطح معنی‌داری ۱/۱۵ به عنوان سطح معنی‌داری اصلاح‌شده، جهت تعیین معنی‌داری نتایج استفاده گردید. ردیف Difference (A-B log scale) بیانگر میزان ddct- برای ژن در گروه تیمارنشده

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

جدول ۱- نتایج آنتی‌بیوگرام تیمول و نانولیپونیوزوم حامل تیمول

برای قارچ کاندیدا آلبیکنس

جدایه	MIC تیمول (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MIC نانوذره لیپونیوزوم حامل تیمول (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MFC نانوذره لیپونیوزوم حامل 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

۹-۳- انتخاب ایزوله مناسب برای بررسی بیان ژن

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

۱۰-۳- بیان ژن نمونه‌های قارچ کاندیدا آلبیکنس

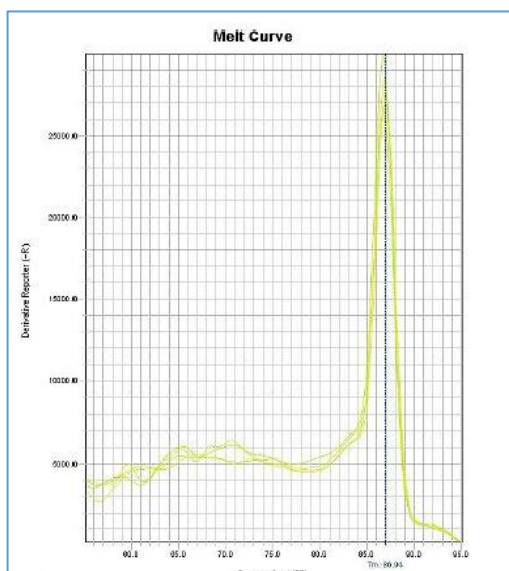
مقاوم به فلوکونازول

بررسی میزان بیان ژن *ERG11* با روش Real-time PCR و با استفاده از نرم‌افزار Gene X و با محاسبه میزان اختلاف در CT (Cycle Time) ایجادشده نسبت به اینترنال کنترل برای نمونه‌های تیمار شده با نانوذره لیپونیوزوم حاوی تیمول و همچنین نمونه 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 به عنوان شناساگر استفاده گردید. میزان CT‌های به دست آمده، توسط برنامه Gene X نمونه کالیبراتور مقایسه و محاسبه گردید. جدایه‌های موردبررسی

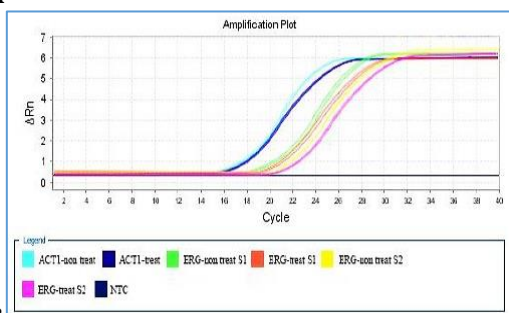
Confidence			95%
Level(14)			
Difference (A-B log scale)			-0.22
Fold Change			-1.17

۱۲-۳- آنالیز منحنی ذوب *ERG11*

پس از مشتق‌گیری از نمودار ایجادشده، منحنی درجهٔ دومی به دست آمد. همان‌طور که در منحنی شکل ۵A آمده است، هر Peak (نقاط ماکزیمم) نمایانگر T_m یک محصول PCR است. با آنالیز منحنی 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 $T_m=86/94$ می‌باشد.



A



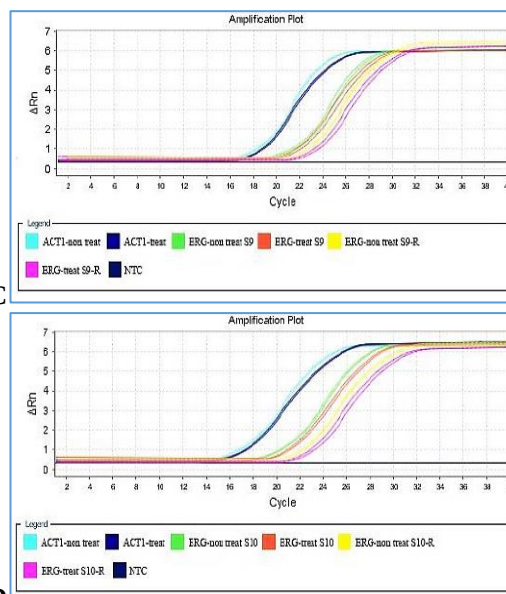
B

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

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

آنالیز آماری ژن <i>ERG11</i> 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 <i>ERG11</i> 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 <i>ERG11</i> 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

می‌شود، بلکه معضل مقاومت دارویی را ایجاد خواهد نمود (۳۰). در نتیجه بررسی عوامل مختلفی که بر ایجاد مقاومت دارویی مؤثر هستند می‌توانند هدف مطالعه‌های محققان قرار گیرند. به همین منظور به دنبال بررسی‌های انجام شده بر مقاومت قارچ کاندیدا / آلبیکس نسبت به داروهای مختلف، ژن‌های *CDR*، *ERG11*، *MDR1*، *CaSKN1*، *PIL1* و *CaKRE1* مؤثر در ایجاد مقاومت دارویی شناسایی شدند (۳۱) و مقاومت دارویی قارچ کاندیدا / آلبیکس به داروهای آزول بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان دادند که بروز جهش‌های شایع بر روی ژن *ERG11* موجب مقاومت 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 بیان ژن *ERG11* در بروز مقاومت دارویی گونه کاندیدا / آلبیکس نسبت به فلوکونازول به عنوان مهم‌ترین داروی شایع مورد مصرف در کاهش عوارض عفونت کاندیدیازیس می‌باشد. به همین منظور با توجه به ظهور روزافزون سویه‌های مقاوم به دارو، بررسی عوامل مؤثر در بیان ژن‌های مقاومت دارویی مورد توجه قرار گرفته است. از آنجایی که امروزه استفاده از داروهای مکمل و پیروی از پروتکل‌های طب مکمل دارای مقبولیت اجتماعی می‌باشد، در نتیجه استفاده از عواملی که بتواند جایگزین داروهای سینتیک شوند، اهمیت و جایگاه ویژه‌ای دارند. به همین منظور بررسی ترکیب‌های طبیعی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته‌اند. در همین راستا، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی که از گذشته مورد استفاده قرار گرفته‌اند، با توجه به اثرهای جانبی بسیار کمتر نسبت به ترکیب‌های شیمیایی در بسیاری از تحقیقات مطرح شده‌اند. یکی از رایج‌ترین ترکیب‌های طبیعی زیستی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند فنل‌ها هستند (۳۳). تیمول جزء اصلی ترکیب‌های فنلی در گیاه زنیان است. تیمول دارای فعالیت ضدقارچی است و اثرهای متفاوتی بر خصوصیات مورفولوژی و ژنتیک میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها دارد (۳۴). امروزه با پیشرفت علم نانو، برای حفاظت بیشتر از ترکیب‌ها و کنترل رهایش ترکیب‌های زیست‌فعال، از نانوحامل‌های لیپیدی به منظور انکپسوله کردن مواد زیست‌فعال استفاده می‌شود که از انواع نانوحامل‌های لیپیدی می‌توان به لیپوزوم و نیوزوم اشاره نمود. نانولیپونیوزوم‌ها حامل‌های دارویی هستند که دارو را



شکل ۵- A. منحنی ذوب ژن *ERG11*، B. میزان بیان ژن *ERG11* در نمونه شماره ۱ نسبت به ژن *ACT1*، C. میزان بیان ژن *ERG11* در نمونه شماره ۹ نسبت به ژن *ACT1*، D. میزان بیان ژن *ERG11* در نمونه شماره ۱۰ نسبت به ژن *ACT1*

۴- بحث

امروزه با توجه به عوامل ایجادکننده نقص در سیستم ایمنی، عفونت‌های قارچی از جمله کاندیدیازیس از جایگاه خاصی در پزشکی و پژوهش‌ها برخوردار می‌باشند. گونه‌های مختلف کاندیدا در بروز بیماری کاندیدیازیس بسیار مؤثر هستند و گونه کاندیدا / آلبیکس بیشترین درصد بروز کاندیدیازیس را سبب می‌شود (۲۷، ۲۸). فاکتورهای زیادی در شکل الگوی اپیدمیولوژیک بروز بیماری کاندیدیازیس تأثیرگذار هستند، به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط گودرز قلعه مهدیخانی و همکاران انجام شده است، مشخص شد که فاکتورهای مانند دیابت، مشکلات گوارشی و آلزایمر در افزایش رشد گونه‌های کاندیدا / آلبیکس و ایجاد علائم بالینی کاندیدیازیس مؤثر می‌باشند (۲۰، ۲۸). وابستگی قدرت بیماری‌زایی گونه‌های کاندیدا / آلبیکس به عوامل دارویی و بروز مقاومت دارویی از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین منظور، ارزیابی حساسیت یک پاتوژن نسبت به دارو جزء مهمی در درمان و مطالعه‌ها می‌باشد و لازم است تست حساسیت دارویی با اندازه‌گیری میزان حداقل مهارکنندگی رشد در شرایط استاندارد آزمایشگاهی و استفاده از پروتکل NCCLS انجام گیرد (۲۹). بررسی حساسیت دارویی از این جهت حائز اهمیت است که نه تنها عدم پاسخ به دارو منجر به عود مجدد بیماری

ایمونولوژیک فراوان است، مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت وجود اثرهای ضدکاندیدیایی نانوذره ساخته شده، اثر این مواد بر روی سایر قارچ ها و همچنین امکان استفاده از آن در بیماری های قارچی، طی مطالعه های بعدی مورد توجه واقع گردد. در مطالعه حاضر نیز اثر مهارتی تیمول انکپسوله شده در نانولیپوزوم با کاهش میزان بیان ژن مقاومت *ERG11* باعث افزایش اثر ضدکاندیدیایی داروی سنتز شده در جدایه های مقاوم به فلوکونازول گردید. بنابراین می توان فرض کرد که تیمول انکپسوله قادر است به طریقی مقاومت به فلوکونازول را کاهش دهد. با توجه به اینکه در جدایه های مقاوم به فلوکونازول کاهش بیان ژن های پمپ افلاکس به وفور مشاهده می شود، در این مطالعه فرض گردید که تیمول انکپسوله شده با اثر بر بیان ژن *ERG11* به عنوان یکی از ژن های مؤثر در انتشار آنتی بیوتیک ها به خارج سلول، باعث اثربخشی آنتی بیوتیک می شود. با توجه به بررسی اپیدمیولوژیک که در نمونه های حاضر در این مطالعه که توسط گودرز قلعه و همکاران جداسازی شده بودند صورت گرفت، نتایج نشان می دهند که بیشترین میزان مقاومت به فلوکونازول و بیان ژن مقاومت *ERG11* در بانوانی مشاهده شده است که به یک بیماری مستعدکننده زمینه ای مانند مشکلات گوارشی، دیابت و آلزایمر مبتلا بوده اند (۲۰).

با توجه به نتایج این مطالعه، میزان بیان ژن در افرادی با مشخصات بیان شده افزایش چشمگیری داشته است (۰/۰۵ > P.value) که این امر می تواند هشدار مهمی در خصوص افزایش دامنه مقاومت دارویی این قارچ به داروهای روتین مورد استفاده باشد.

۵- نتیجه گیری

کاربرد داروهای گیاهی مانند زنیان به دلیل ارزان، بومی، در دسترس بودن، با تأثیر بسیار زیاد و مناسب می تواند اثر فزاینده ای در کاهش عوارض حضور قارچ کاندیدا/آلبیکنس در مبتلایان به کاندیدیازیس داشته باشد. از طرفی ساخت این داروها به صورت انکپسوله شده (لیپوزوم) باعث رهايش دارو به میزان کمتری بر روی قارچ ها می شود، لذا در این شرایط دارو سمیت کمتری بر بدن انسان خواهد داشت. به هر حال این زمینه نیاز به انجام پژوهش های گسترده تری

در مقابل تخریب حفاظت می کنند و باعث افزایش راندمان اثرگذاری، کاهش میزان فراریت اسانس ها و کاهش اکسیدشوندگی می گردند (۳۵). در مطالعه های گسترده ای از نانولیپوزوم ها با ترکیب ها و فرمولاسیون متنوعی به عنوان حاملی برای داروها و ترکیب های مؤثر بر قارچ ها استفاده شده است، به عنوان مثال در مطالعه ای اثربخشی ضدقارچی امیدوارکننده نانولیپوزوم های بارگذاری شده با روغن میخک و درخت چای بر روی *تریکوفایتون روبروم*^۱ بررسی گردید (۳۶). در مطالعه ای دیگر نانولیپوزوم های حاوی فلوکونازول به طور قابل توجهی MIC را در برابر *آسپرژیلوس فلاووس*^۲ و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*^۳ کاهش دادند (۳۷). در مطالعه ای دیگر نانولیپوزوم های حاوی وریکونازول^۴ بر فعالیت بیولوژیکی و بیان ژن های *ERG11*، *CDR1* و *CDR2* در کاندیدا/آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول انجام شد و نشان داده شد که فرمولاسیون لیپوزومی وریکونازول می تواند بیان ژن های مقاوم به آزول را در مقایسه با فرم آزاد وریکونازول بیشتر کاهش دهد (۳۸). در مطالعاتی دیگر نشان داده شد که فعالیت ضدقارچی نیستاتین^۵ لیپوزومی در شرایط آزمایشگاهی و در برابر گونه های آلبیکنس مؤثرتر از نیستاتین آزاد می باشد (۳۹، ۴۰). در مطالعه ای دیگر مشخص شد که اثرهای ضدقارچی اسانس آویشن به صورت فرمولاسیون نانولیپوزومی نسبت به فرم آزاد به طور قابل توجهی افزایش یافته است (۴۱). همچنین در مطالعه ای دیگر، فعالیت ضدقارچی نیوزوم حاوی کتوکونازول در مقابل کاندیدا/آلبیکنس، MIC کمتری نسبت به داروی خالص داشته است (۴۲). به علاوه در مطالعه ای دیگر، فرمولاسیون نیوزومی کروسین در ترکیب با فلوکونازول اثربخشی قابل توجهی در برابر جدایه های حساس و مقاوم کاندیدا/آلبیکنس نشان داد (۴۳). با توجه به مطالعه های انجام شده، فرمولاسیون لیپوزومی و نیوزومی نقش مؤثری در اثربخشی و حفظ ترکیب های ضدقارچی دارد و با توجه به اینکه اطلاعات چندانی در خصوص اثرهای ضدقارچی نانوذره حامل تیمول بر گونه های کاندیدا موجود نمی باشد، طی مطالعه اخیر، اثرهای نانوذره با فرمولاسیونی مبتنی بر لیپوزوم و نیوزوم با عنوان نانولیپوزوم، بر روی مخمر کاندیدا/آلبیکنس که مهم ترین عامل اتیولوژیک بیماری کاندیدیازیس با زمینه های مستعدکننده فیزیولوژیک و

^۴ Voriconazole

^۵ Nystatin

^۱ *Trichophyton rubrum*

^۲ *Aspergillus flavus*

^۳ *Aspergillus fumigatus*

در شرایط *in-vitro* و *in-vivo* دارد تا در آینده بتواند به صورت یک داروی همه جانبه مورد استفاده قرار گیرد.

۶- ملاحظات اخلاقی

این مطالعه به صورت *in-vitro* روی ایزوله های بالینی کاندیدا/آلبیکنس انجام شد. تمامی نمونه ها بدون اطلاعات شناسایی بیماران به دست آمد و استفاده از آنها مطابق دستورالعمل های بیمارستان و آزمایشگاه انجام شد. آزمایش ها با رعایت استانداردهای ایمنی زیستی صورت گرفت و تأیید اخلاقی انسانی یا حیوانی برای مطالعه نیاز نبود.

۷- تشکر و قدردانی

از تمامی مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال خصوصاً دانشکده علوم زیستی که در انجام فعالیت ها

و امور آزمایشگاهی این پژوهش، کمال همکاری و مساعدت را داشته اند سپاسگزاری می گردد.

۸- تعارض و منافع

نویسندگان اعلام می دارند تعارض منافی ندارند.

۹- سهم نویسندگان

محدثه لاری پور: طراحی، نظارت عملی، تحلیل و تفسیر داده ها
حورا دادگستر: جمع آوری داده ها، تحلیل و تفسیر داده ها
محمدرضا رضوی: نظارت علمی و جمع آوری داده ها
زهرا گودرزقلعه مهدیخانی: اجرای بخش عملی

۱۰- کد اخلاق

IR.IAU.PS.REC.1398.211

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, Mgbeahurike 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).

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.

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.