

ارزیابی مقایسه‌ای اثرات ضد قارچی اسانس گیمنما سیلوستر (*Gymnema Sylvestre*) نانوانکپسوله و نانوزل کیتوزان بر تشکیل بیوفیلم کاندیدا البیکنس

سپیده اکبری^۱، منصور بیات^{۲*}، شهلا رودبارمحمدی^۳، جمال هاشمی^۴

چکیده

بیوفیلم کاندیدا/البیکنس نسبت به طیف وسیعی از درمان‌های موثر بیماری‌های قارچی، تولرانس و محدودیت نشان می‌دهد. این مساله بعنوان یکی از چالش‌های حوزه بهداشت و درمان مطرح بوده و انتخاب روش‌های درمانی مناسب و موثر را اجتناب ناپذیر می‌سازد. مطالعه حاضر با هدف سنتز نانوزل به روش خودتجمعی، با کمک اتصالات عرضی برای همبسته کردن پیوندکیتوزان-میرسیتیک اسید و درون پوشانی اسانس گیمنما سیلوستر جهت مهار رشد بیوفیلم سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس انجام گرفت. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوساختار با استفاده از آنالیزهای XRD, DLS, TEM, SEM, مشخصه‌یابی شد. جهت تعیین الگوی حساسیت داروی‌های ضد قارچی نسبت به فرم مخمری و بیوفیلمی سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس (ATCC ۱۰۲۳۱) از روش میکرو برات دایلوئن با پروتکل استاندارد CLSI M27-A3 و تست کمی XTT استفاده شد. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی MIC_{۵۰} نانوزل کیتوزان و اسانس گیمنما سیلوستر نانوانکپسوله به ترتیب ۵/۷ μg/mL و ۲/۳ μg/mL و میزان MIC_{۹۰} به ترتیب ۸۴/۳ μg/mL و ۴/۶ μg/mL تعیین ویژگی گردید. بر اساس نتایج روش XTT حداقل غلظت مهارکنندگی بیوفیلم MBIC نانوزل کیتوزان و اسانس گیمنما سیلوستر نانوانکپسوله در غلظت ۱۵۰ μg/mL و ۵/۱ μg/mL و داروی ازولی ایتراکانازول در محدوده غلظت ۱۶/۱ μg/mL ≥ گزارش شد. یافته‌های این مطالعه، اهمیت نانوزیست فناوری و بکارگیری نانو داروهای گیاهی را به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی در درمان عفونت‌های کاندیدایی مقاوم به دارو ضروری می‌داند.

واژگان کلیدی: کاندیدا البیکنس، بیوفیلم، نانوزل کیتوزان، گیمنما سیلوستر،

تست XTT

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۲۱

مقدمه

طی یک دهه گذشته، میزان بروز و شیوع عفونت‌های کاندیدایی مهاجم (IFI; Invasive Fungal Infections) افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است. گونه‌های کاندیدا به ویژه کاندیدا/البیکنس بعنوان شایع‌ترین پاتوژن فرصت طلب در طیف گسترده‌ای از میزبان‌های مبتلا به نقص ایمنی و اختلالات متابولیکی مزمن نقش بارزی ایفا می‌کند (۱). الگوی حساسیت دارویی این قارچ به واسطه حضور ریسک فاکتورهای نوپدید و باز پدید، مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و کورتیکواستروئیدهای وسیع‌الطیف، توأم با پاندمی Covid-۱۹ تغییر یافته است. این قارچ دیمورفیک، با توانایی تشکیل ماتریکس آگرو پلی ساکاریدی (EPS; Exopolysaccharide) و ایجاد ساختار سیستم سه بعدی بیوفیلم، تحت شرایط اسموتیک بالا و شارژ منفی محیط، التهاب پایدار، نکروز و آسیب شدید بافتی ایجاد می‌کند (۲). تغییر الگوی مقاومت فنوتیپی و مولکولی بیوفیلم، به پادزیست‌های کلاسیک ضد میکروبی و داروهای ضد قارچی، وابسته به تنش و استرس محیطی، بیان مقاومت ژنی القاء شده و فرکانس موتاسیون بیوفیلم می‌باشد. اخیراً سامانه‌های نوین دارورسانی هدفمند مبتنی بر نانو تکنولوژی، جهت بهینه‌سازی کلیرانس دارو، افزایش فراهمی زیستی، بهبود حلالیت و ارتقاء پروفایل توزیع دارو

۱. دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه پاتوبیولوژی، قارچ شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران dr.bayat.mansour@gmail.com

۳. گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران

اسانس گیمنما سیلوسترنانو انکپسوله و داروی ضد قارچی ایتراکونازول بر تشکیل بیوفیلم قارچی سویه استاندارد *کاندیدا/البیکنس* مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

سنتز نانوزل کیتوزان و بارگذاری اسانس گیمنما سیلواستر
نانوزل کیتوزان-میرسیستیک اسید به روش خود تجمعی با فرایند اتصالات عرضی تهیه گردید (۸، ۱۱). در ابتدا، مقدار ۱ گرم کیتوزان (Sigma) با وزن مولکولی متوسط در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک (Merck) ۱درصد حل شده و به مدت ۲۰ دقیقه تحت شرایط کاویتاسیون اولتراسونیک قرار گرفت. مخلوط کرانس لینکرهای (EDC/ NHS) و اسید میرسیستیک (Sigma) به صورت قطره ای به محلول کیتوزان بر روی همزن مغناطیسی اضافه گردید. با افزودن اتانول عمل استیری شدن در شرایط تاریکی و زیر دستگاه هود ادامه یافت. pH محلول با سود یک مولار تنظیم و سوسپانسیون حاصل با پروسه سانتریفوژ با سرعت بالا در دمای ۴ °C رسوب گذاری شد. بعد از سه بار شستشو، با افزودن اسید استیک مجدداً سونیکاسیون انجام و جهت حذف ناخالصی ها، محلول نانوزل فیلتر گردید. بارگذاری اسانس گیمنما سیلواستر در نانوزل کیتوزان براساس بیشترین میزان کارایی موثر در شرایط بن ماری اولتراسونیک هموژنایزر (Power Sonic S10) انجام شد. نهایتاً برای بررسی درصد میزان انکپسولاسیون از روش تغییرات طیف جذبی و منحنی کالیبراسیون استفاده گردید (۹).

ارزیابی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی نانو ساختارها

جهت بررسی ویژگی های سطحی، مرفولوژی و سایز نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM-KYKY-EM3200) استفاده شد. در این از مون نمونه های سنتزی پس از خشک شدن در دمای محیط و پوشش دهی با طلا با اعمال ولتاژ زیر ۳۰ کیلو ولت در شرایط تحت خلاء مورد

مورد توجه محققین قرار گرفته است (۳). کیتوزان (Chitosan) فرم مشتق شده از کیتین، یک بیوپلیمر کاتیونیک چند منظوره با ساختار پلی ساکاریدی بوده که در محیط اسیدی ابی محلول است. این فراورده زیستی با ویژگی های بیولوژیکی متنوع ادجوانیستی، زیست تخریب پذیری، سازگاری زیستی بالا، عدم سمیت و در دسترس بودن به عنوان نانوحامل دارویی کاربرد بالقوه داشته و فعالیت های فایتوبیوتیک، ضد قارچی- میکروبی و انتی بیوفیلمی آن مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۵). کیتوزان با ایجاد پیوندهای الکترواستاتیک با انیون و بسپارهای دارای بار منفی با تولید نانو پارسیکل ها در فرایند درون پوشانی، جهت افزایش کارایی و پایداری ترکیبات زیست فعال مانند متابولیت های ثانویه گیاهان داروئی بکار می رود. نانو ذرات کیتوزان پتانسیل بالایی جهت کپسولاسیون مواد موثره گیاهان داروئی داشته و آنها را در برابر عوامل ارگونومی محیطی (گرما، نور، UV) محافظت می کند. بنابراین با کاهش فراریت ترکیبات زیست فعال اسانس، موجب ارتقاء هم افزایی و برهمکنش مثبت اثرات ضد قارچی و بیوفیلمی می شود.

گیمنما سیلواستر با نام علمی (*Gymnema Sylvestre L.*) گیاه داروئی چند ساله متعلق به خانواده Asclepiadaceae بوده و در طب سنتی هندوچین - آیورودا (Ayurveda) به نام گورمار شناخته شده است. اثرات فارماکولوژیک این گیاه در درمان دیابت، مالاریا، اسم و الرژی، برونشیت، دیس لیپیدمی، بیماریهای التهابی و روماتیسمی کاربرد دارد (۶). مهم ترین ترکیب بیوزیستی فراکشن موثره این گیاه اسید گیمنمیک می باشد که از پتانسیل ضد قارچی، میکروبی، ویروسی و آنتی اکسیدانی بالایی برخوردار بوده و فعالیت مهارتی آن بر ویروانس *کاندیدا/البیکنس* به اثبات رسیده است (۷). لذا تحقیق حاضر با هدف ارزیابی عملکرد اثرات ضد کاندیدایی نانوزل کیتوزان،

آنالیز قرار گرفت و میکروگراف ها ثبت شد. به منظور تأیید ریخت شناسی ریز ساختارها و اندازه آنها با میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM (Philips EM 208 S) نمونه های نازک روی شبکه مسی پوشیده با فیلم کربنی تثبیت گردید. به واسطه پرتوهای عبوری و پراش امواج الکترونی پراکنده شده از عدسی های اپتیکی با کمک ولتاژ شتاب دهنده زیر ۱۰۰ کیلو ولت ثبت گرافها مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین الگوهای مختلف فازهای کریستالی نانوذرات و شناسایی ساختمان سه بعدی از ازمون XRD (Lamda 35, Perkin-Elmer) با منبع تابش پرتوی تک رنگ کاتدی Cu K α استفاده شد. اندازه گیری بار سطحی (پتانسیل زتا)، شاخص پراکندگی و میانگین اندازه و توزیع نانوذرات توسط روش تفریق نور دینامیکی پویا DLS با به کارگیری دستگاه زتا سایزر (Malven Nano Zs) با زاویه شناسایی ۹۰ درجه و تابش نور لیزر در دمای ۲۵ °C انجام یافت. الگوی رهایش اسانس از سامانه نانوستز شده با روش کیسه دیالیز در مجاورت فسفات بافر سالین PBS در شرایط برون تنی انجام شد. با جایگزینی منظم و متناوب بافر در فواصل زمانی مختلف و مطابق با شرایط فیزیولوژیک بدن به مدت یک هفته نمودار آزاد سازی تعیین و رسم گردید (۹).

تعیین الگوی حساسیت نسبت به داروهای ضد قارچی

ازمایش حساسیت دارویی و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC; Minimum Inhibitory concentration) به روش برات میکرودايلوشن با پروتکل استاندارد CLSI بر اساس مستندات M27-A3 در پلیت های ۹۶ خانه ای پلی استرین، ته صاف انجام شد (۱۰). در این روش، استوک داروها مطابق دستورالعمل توسط حلال DMSO (Merck) آماده گردید. محدوده رقت دارویی اسانس گیمنما سیلستر تهیه شده از شرکت بارچ اسانس (۳۰۰-۲/۳) میکروگرم در میلی لیتر، نانوذله کیتوزان - میریستیک اسید سنتزی (۳۰۰-۹/۴) میکروگرم در میلی لیتر، اسانس نانو انکپسوله

سنتزی (۱۵۰-۱/۱۷) و رقت داروی ضد قارچی ایتراکونازول (Sigma) در دامنه (۶۴-۰/۰۱۶) میکرو گرم در میلی لیتر به طور مجزا تعیین شد. ابتدا رقت های متوالی دارویی دو برابر از عوامل ضد قارچی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ال-گلوتامین و بافر MOPS تهیه و سپس به چاهک های حاوی محیط کشت (Yeast YNB; Nitrogen Broth) منتقل گردید. برای هر سری کنترل مثبت (چاهک بدون دارو) و منفی (چاهک بدون مخمر) در نظر گرفته شد. سوسپانسیون تازه احیاء شده از کشت ۲۴ ساعته سویه استاندارد کاندیدا/البیکس (ATCC ۱۰۲۳۱) با تراکم سلولی (CFU/mL) 1×10^3 تهیه و به چاهک ها اضافه شد. جذب نوری چاهک ها پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ °C با استفاده از دستگاه الیزایدر قرائت و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC ۵۰ و ۹۰) در مقایسه با گروه های کنترل مثبت و منفی تعیین شد. حداقل غلظت کشندگی (MFC; Minimum Fungicidal Concentration) در محیط کشت مولر هیتون اگر بعد از انکوباسیون مشخص گردید. تمام تست ها سه بار تکرار شد.

بررسی کمی اثرات ضد بیوفیلمی با روش XTT

سنجش میزان تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروپلیت در شرایط آزمایشگاهی انجام یافت (۱۲). برای ایجاد فاز چسبندگی، سوسپانسیونی به غلظت 1×10^6 CFU/mL در محیط YNB حاوی ۱۰۰ میلی مولار گلوکز تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک ها تلقیح گردید. میکروپلیت ها در شیکرانکوباتور (Scientific Stuart) به مدت ۹۰ دقیقه با سرعت ۷۵ دور در دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. برای حذف سلول های آزادزی، محتویات روشنین تخلیه و چاهک ها سه بار با فسفات بافر سالین PBS شسته شد. با افزودن مجدد ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت غنی شده فوق الذکر به چاهک ها، روند بلوغ بیوفیلم

با پروسه انکوباتور شیکر به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. با شستشوی سه مرحله ای و افزودن رقت های دارویی در غلظت های subMIC به همراه بافر RPMI پروسه انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت تکرار گردید. چاهک حاوی سوسپانسیون مخمری و فاقد دارو به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از تشکیل بیوفیلم و تیمار با داروهای ضد قارچی، به منظور بررسی فعالیت متابولیکی سلول های زنده و تعیین درصد بقاء از رنگ حیاتی نمک تترازولیوم XTT (Sigma) استفاده گردید (۱۴،۱۳). در ابتدا، غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر از XTT در بافر رینگر لاکتات (Ringer's) lactate تهیه و با فیلتر سرنگی استریل شد. سپس محلول منادیون در استون به غلظت یک میلی مولار قبل از مصرف بلافاصله آماده شد. نهایتاً، حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط تازه تهیه شده (منادیون/XTT) به چاهک های میکروپلیت شسته شده از مرحله قبل و دارای محیط کشت افزوده گردید و در شرایط تاریکی در دمای ۳۷ °C بمدت سه ساعت تحت انکوباسیون قرار گرفت. تغییرات کالریمتریک و میزان جذب نوری پلیت ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر قرائت شد. جهت انجام صحت آزمون هر نمونه سه بار تکرار شد. آنالیز آماری

در این پژوهش تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار Two way Prism (Graph Pad Prism 10.4.2) و تست ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین ها با در نظر گرفتن انحراف معیار $\pm$ انحراف استاندارد برای انجام پذیرفت ($P < 0.05$).

نتایج

یافته های بررسی مشخصات نانو ساختارهای سنتزی

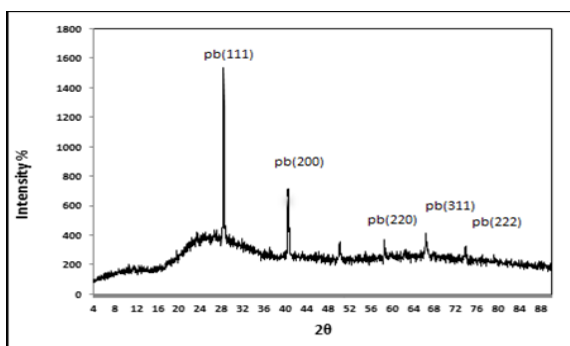
بر اساس تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM (نگاره ۱و۲)، مرفولوژی سطحی نانو

ساختارهای سنتزی بصورت همگن، نسبتاً منظم و صاف، بدون تجمع در ساختاری پایدار بوده و میانگین اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر مشاهده می شود. ایجاد یک مجتمع تقریباً کروی با زمینه توپوگرافی یکنواخت بعلت، هارمونی تجمع سرهای غیر قطبی به داخل و سرهای قطبی به خارج بوده که در نتیجه اتصال میرستیک اسید غیر قطبی با کیتوزان و قرار گرفتن در محیط قطبی می باشد. عوامل دینامیکی مانند فرایند فراصوت اولیه مانع از شکل گیری نانوزل با زنجیره بلند و فراصوت ثانویه منجر به کاهش اندازه ذرات شده است و نهایتاً فیلتراسیون در شکل گیری خالص سازی بهینه نانوزل نقش موثری دارد. الگوی طیف سنج پراش اشعه ایکس (XRD) مربوط به نانوزل کیتوزان در (نگاره ۳) نشان داده شده است. نتایج بر اساس قانون پراش براگ به صورت تابعی از شدت سنجی در محدوده پراکندگی زاویه پراش 2θ از ۴ تا ۸۸ درجه به دست آمد. الگوی پراش با ولتاژ شتاب دهنده ۴۰ کیلووات و شدت جریان ۳۰ میلی آمپر با پرتوی کاتدی با طول موج معین $\lambda = 0.154$ انگستروم حاصل شد. طبق نتایج آنالیز دیفراکتوگرام های XRD پنج پیک مشخص برای نانوزل ثبت گردید. طیف حاصل از اندازه گیری پتانسیل الکتریکی، پیک مخصوص نانو ساختار ها در محدوده پراکندگی زاویه پراش 2θ از ۲۰ تا ۴۰ درجه را نشان می دهد. این امر در سطح نانو ذرات سنتزی، کم بودن بار سطحی و افزایش پایداری نانوزل کیتوزان را به دنبال خواهد داشت. در نانو اسانس انکپسوله (نگاره ۴) این پنج پیک بصورت شدیدتر و تیز تر ظاهر شده و به همراه ضریب فشردگی نشان دهنده بارگذاری اسانس در سامانه نانویی می باشد. ماکزیمم پیک جهت نانو اسانس انکپسوله در داده های تفرق پرتو ایکس بصورت فوتون بر حسب زاویه دتکتور $2\theta = 25^\circ$ مشاهده گردید. علاوه بر این، خلوص بالای ترکیبات سنتز شده با عدم حضور پیک های مربوط به ناخالصی مشخص شد.

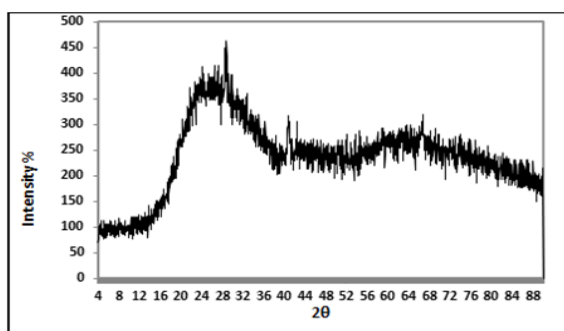
محیط پیرامون، ازاد سازی اسانس سریع تر است. در فاز دوم، ازاد سازی تجمعی به آرامی ادامه یافته و بعد از ۴ روز میزان رهایش $85/38 \pm 2$ درصد تعیین گردید. نهایتاً، میزان کلی رهایش طی ۷ روز بصورت هسته رهش به میزان $2 \pm 98/38$ درصد ثبت و نتایج با استفاده از منحنی استاندارد رسم شد.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی اسانس نانو انکپسوله

۹۵±۸.۱	میانگین اندازه ذره با DLS (نانومتر)
۱۱.۰۷±۰.۳	پتانسیل زتا (میلی ولت)
۹۰±۷.۶	اندازه متوسط قطر ذرات با SEM (نانومتر)
۰.۱۸۹±۰.۰۶	PdI
۸۶.۲±۰.۹۱	میزان انکپسولاسیون (درصد)

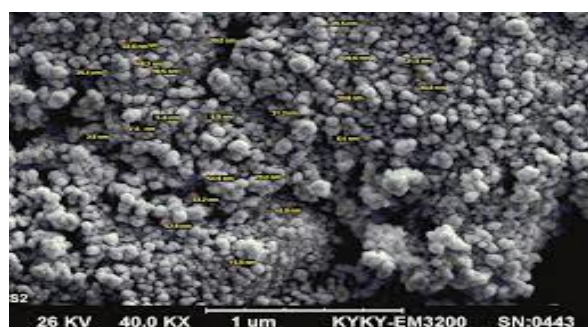


نگاره ۳- طیف سنج پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذل

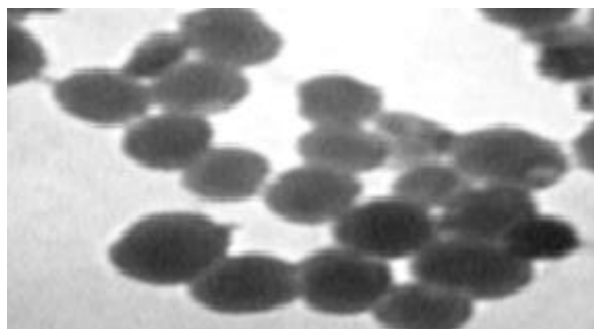


نگاره ۴- طیف سنج پراش اشعه ایکس (XRD) اسانس نانو انکپسوله

متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی، پراکندگی اندازه ذرات (PdI) و پتانسیل زتا با روش پراکندگی نور دینامیکی DLS نمایانگر پایداری سوسپانسیون حاوی نانوذرات انکپسوله می باشد (جدول ۱). شاخص پایین پراکندگی ($0/18$)، توزیع یکنواخت اندازه، عدم تجمع و رسوب نانوذرات را تایید می کند بر این اساس Z-average ذرات بر حسب نانومتر با نتایج حاصل از میکروسکوپ های الکترونی همخوانی دارد (نگاره ۵).



نگاره ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) اسانس نانو انکپسوله



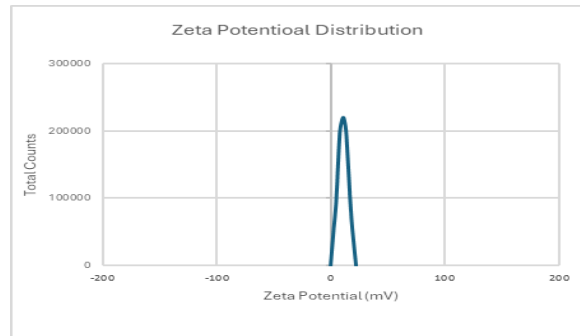
نگاره ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) نانوذل کیتوزان

پروفاایل فراهمی زیستی نشانگر فاز ازاد سازی اسانس با مشخصه ثابت سیستم تعادلی می باشد. نتایج حاصل از پارامتر الگوی ازاد سازی دو مرحله ای اسانس گیمنما سیلستر درون پوشانی شده از نانوذل کیتوزان (نگاره ۶) در فاز اول نشانگر روند رهایش افزایشی بصورت کنترل شده در طی ۲۴ ساعت اولیه به میزان ۴۶ درصد می باشد. در این فاز به دلیل اختلاف غلظت زیاد اسانس در سامانه با

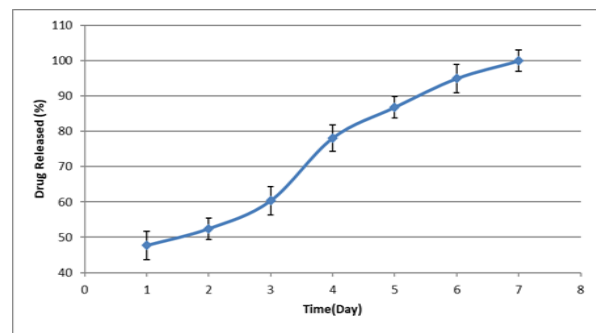
کاندیدا بیانگر اثر مهاری ۵۰ درصدی در تمام غلظت های فوق الذکر بوده که نتایج فوق در مقایسه با نانواسانس انکپسوله در سطح معنا داری می باشد ($P < 0/05$). براساس نتایج بدست آمده از MIC₉₀ نانواسانس انکپسوله جهت مهار سویه استاندارد، در غلظت ۴/۶ میکروگرم در میلی لیتر در مقایسه با اسانس در غلظت ۳۷/۱ و نانوزل در غلظت ۸۴/۳ میکروگرم در میلی لیتر در سطح معنا داری قرار دارد. میزان MIC₉₀ داروی آزولی ایتراکونازول در غلظت ≥ 1 میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد که در مقایسه با اثر مهاری ۹۰ درصدی نانواسانس انکپسوله از نظر آماری در سطح معنادار گزارش گردید ($P < 0/05$). همچنین میزان کشندگی MFC نانواسانس انکپسوله در غلظت ۴/۹ میکروگرم در میلی لیتر بیشتر از فعالیت کشندگی اسانس و نانوزل اندازه گیری شده که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. اما نتایج حاصل از کشندگی داروی آزولی ایتراکونازول در غلظت ≥ 4 میکروگرم در میلی لیتر در مقایسه با نانواسانس انکپسوله از نظر آماری در سطح معناداری قرار ندارد ($P > 0/05$).

نتایج در صد بقاء سلول های بیوفیلمی

روش سنجش کمی XTT جهت بررسی درصد بقای فرم بیوفیلمی کاندیدا/البیکنس تیمار شده با عوامل ضد قارچی ارائه گردید. این پروسه با روند فعالیت متابولیکی انزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز در سلول های زنده و احیای رنگ حیاتی تترازولیوم انجام شد. نتایج ازمون XTT (نگاره ۸) نشان داد که قدرت مهار کنندگی MBIC₅₀ اسانس، نانو ژل کیتوزان - میریستیک اسید و نانواسانس انکپسوله، در غلظت های ۲۴، ۱۵۰، ۵/۱ میکروگرم در میلی لیتر از نظر آماری نسبت به کنترل در سطح معناداری قرار دارند ($P < 0/0001$). بر طبق یافته ها، داروی ضد قارچی ایتراکونازول در غلظت $\geq 16/1$ میکروگرم در میلی لیتر توانایی مهار کنندگی ۵۰ درصد سلول های فرم بیوفیلمی را



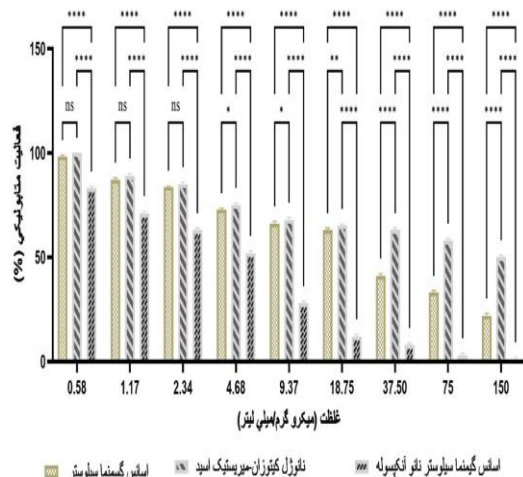
نگاره ۵-پراکندگی پتانسیل زتا اسانس گیمنما سیلستر نانوانکپسوله



نگاره ۶-الگوی رهائش اسانس گیمنما سیلستر از سامانه نانویی

پروفایل نتایج حاصل از حساسیت دارویی با تکنیک میکروبراث دایلوشن

نتایج مربوط به بررسی MIC و MFC اسانس گیمنما سیلستر، نانوزل کیتوزان و نانواسانس انکپسوله برای سویه استاندارد ATCC ۱۰۲۳۱ کاندیدا/البیکنس در شرایط آزمایشگاهی (نگاره ۷) نشان داده شده است. بر طبق داده های ذیل، افزایش بازدارندگی و کشندگی سویه استاندارد پس از تیمار با عوامل ضد قارچی تابعی از غلظت های وابسته به دوز می باشد. نانواسانس انکپسوله در غلظت ۲/۳ میکروگرم در میلی لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد سلول های مخمری بوده که در مقایسه با اسانس در غلظت ۱۸/۹ و نانوزل با غلظت ۵۷/۵ میکروگرم در میلی لیتر از نظر آماری در سطح معناداری قرار دارد. بررسی تاثیر غلظت های مختلف داروی ایتراکونازول در محدوده ۰/۵-۰/۶۳ میکروگرم در میلی لیتر بر رشد فرم مخمری سویه

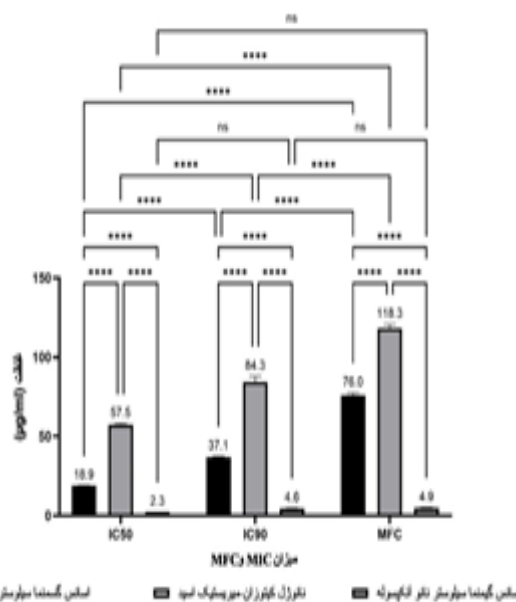


نگاره ۸- نمودار مقایسه ای فعالیت متابولیکی بیوفیلم سویه استاندارد ۱۰۲۳۱ ATCC کاندیدا البیکس تیمار شده با داروهای ضد قارچی با روش XTT. ****(P<0.0001), *** (P<0.01), ** (P<0.05), ns: Non-Significant.

بحث

مزمین شدن آنها، یافتن ترکیبات طبیعی دارای خواص ضد قارچی در الویت قرار گرفته است. نانو تکنولوژی به عنوان یک فرصت متحول کننده و مقرون به صرفه با گسترش پلتفرم های سبز و بکارگیری گیاهان دارویی، زمینه را برای هدفمندی دارورسانی، بهبود پایداری دارو به همراه کاهش اثرات جانبی آن فراهم ساخته است. نانوذله بر پایه کیتوزان تحت پدیده خودتجمعی (Self-aggregation phenomenon) با شارژ مثبت به کمک ابزار حدواسط (Cross-Linkers) EDC/NHS و ایجاد پیوند آمیدی بین گروه های آمین ازاد کیتوزان و گروه های کربوکسیل میرستیک اسید، بدون فضای اضافی (Zero-length)، سنتز گردید (۱۵). کیتوزان دارای شناسه های غیر (ایمونوژنیک، کارسینوژنیک -الژنیک)، ضد قارچی- میکروبی بوده و این ویژگی ها کیتوزان را کاندید استفاده از سیستم های حمل دارویی (drug delivery) می نماید (۱۶، ۱۷). بر طبق الگوی XRD، نانوذله و نانواسانس انکپسوله و مقایسه دو طیف می توان دریافت که شدت هر

داشته که در مقایسه با نانواسانس انکپسوله در سطح معناداری می باشد. بر این اساس قدرت مهار کنندگی MBIC₉₀ بیوفیلم برای نانو اسانس انکپسوله در غلظت ۱۸/۷۵ و داروی ازولی با غلظت ≥ 24 میکرو گرم در میلی لیتر مشخص گردید. قدرت بازدارندگی نانواسانس انکپسوله در غلظت ۱۸/۷۵ میکرو گرم در میلی لیتر ۶۰ درصد بیشتر از نانوذله و ۵۲ درصد بیشتر از اسانس و در غلظت ۷۵ میکرو گرم در میلی لیتر ۵۶ درصد بیشتر از نانوذله و ۳۱ درصد بیشتر از اسانس گزارش گردید. بر این اساس در غلظت ۱۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر میزان کشندگی نانواسانس انکپسوله ۵۰ درصد بیشتر از نانوذله و ۲۳ درصد بیشتر از اسانس بوده که نسبت به کنترل در سطح معناداری تعیین شد.



نگاره ۷- نمودار سنجش حساسیت داروهای ضد قارچی بر روی سویه استاندارد ۱۰۲۳۱ ATCC کاندیدا البیکس با روش میکروبراث دایلوژن ****(P<0.0001), ns: Non-Significant

و نانوزل به ترتیب در محدوده (۳۷/۱-۱۸/۹) و (۸۴/۳-۵۷/۵) میکرو گرم در میلی لیتر می باشد. در این راستا، توانایی مهارکنندگی نانواسانس انکپسوله با میانگین غلظتی $3/1 \pm 45/1$ به مراتب بیشتر از نانوزل با میانگین غلظتی $71/1 \pm 1$ می باشد. این موضوع بیانگر تاثیر مواد موثره ضد قارچی اسانس گیمنما سیلستر و هم افزایی افزایشی آن با نانوزل تحت تاثیر تراکم غلظتی است که با تحقیق Khoshbakht و همکاران منطبق بوده اما ماده موثره آنها متفاوت می باشد (۲۴). Beverly و همکاران با مطالعه تاثیر عصاره ابی، متانولی، کلرفرمی و هگزانی، گیاه گیمنما سیلستر بر گونه کاندیدا/البیکنس میزان مهارکنندگی آن را >100 میلی گرم در میلی لیتر گزارش دادند و از طرف دیگر Veetil و همکاران فعالیت ضد بیوفیلمی عصاره متانولیک گیمنما سیلستر بر کاندیدا/البیکنس را مورد تایید قرار داده است (۲۳،۲۲). Arora و همکاران طی یک بررسی اثرات بالقوه ضد قارچی و باکتریایی اسانس گیمنما سیلستر بر روی کاندیدا البیکنس و کاندیدا تروپیکاليس جهت مهار جرمینیشن و رشد هایف را نشان دادند (۲۷). بر اساس یافته های VEDIYAPPAN و همکاران ماده موثره گیاه (گیمنمیک اسید) با روش میکرودايلوشن با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تشکیل ۹۰ درصد جرم تیوب کاندیدا البیکنس ممانعت می کند (۲۸). شایان ذکر است که نتایج سنجش کمی بیوفیلیم با تست XTT بر اساس تغییر رنگ زرد حیاتی نمک ترازولیوم به فورمازان ارغوانی رنگ محلول در آب و سنجش آن در سوپرناتانت سلولی می باشد. اندازه گیری میزان جذب نوری نشانگر میزان زنده مانی سلول های بیوفیلیمی بوده که با افزایش غلظت و فعالیت مهاري عوامل ضد قارچی کاهش قابل توجهی داشته است. مطالعه حاضر نشان داد که در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نانواسانس انکپسوله به میزان ۹۹/۹ درصد قدرت کشندگی

پراش در اثر بار گذاری بيو دارو، کاهش یافته و فرم کریستالی نانوزل پس از بارگذاری و پوشش دهی با کیتوزان به فرم امورف تبدیل شده است. کاهش شدت پراش بدلیل اتصال گروههای امین با کیتوزان موجب افزایش مقدار زاویه 2θ می شود. مقایسه نتایج با آنچه در مطالعه Ing و همکاران (۲۰) گزارش شده است، بیانگر تطابق نتایج می باشد. بر اساس این پروتکل به علت خاصیت سنرژیستی کیتوزان با اسانس گیمنما سیلستر، میزان درون پوشانی با کارایی $86/2 \pm 0/91$ درصد مشخص گردید که با یافته های Zhavah و همکاران مطابقت داشت (۲۶). رهایش اسانس از حامل ها به فاکتورهایی مانند بر همکنش های الکترواستاتیکی بین اجزای تشکیل دهنده اسانس، گروه های عاملی حامل، خاصیت اسمزی، تغییرات ساختاری القا شده حامل در حضور اسانس و تغییرات محیطی وابسته است. نانواسانس انکپسوله در مدت ۱ هفته در محیط PBS در pH فیزیولوژیک طی دو فاز، به طور کامل رهایش یافت. با توجه به ویژگی موکو ادهزینی لایه پوششی کیتوزان در اطراف نانوساختارها از آزاد سازی سریع دارو جلوگیری کرده و شرایط هسته رهش و هدفمند برای تاثیر گذاری بیشتر در درمان های طولانی مدت را فراهم می آورد. بر طبق مقایسه نتایج، آزاد سازی داروی ضد قارچی ایتراکونازول در محیط PBS بسیار سریع تر بوده و رهایش در زمان ۴ الی ۶ ساعت صورت می گیرد. الگوی آزاد سازی دو مرحله ای افزایشی و کاهشی اسانس گیمنما سیلستر درون پوشانی شده از نانوزل کیتوزان با نتایج کریمی و همکاران از رهایش اسانس اویشن نانوکپسوله و یافته های Souza و همکاران از رهایش اسانس لیمو انکپسوله مطابقت دارد (۲۵،۲۱).

در تحقیق حاضر، موثرترین غلظت نانو اسانس انکپسوله برای مهار رشد فرم مخمری سویه استاندارد کاندیدا/البیکنس در محدوده sub MIC (۲/۳-۴/۶) و جهت اسانس

- chitosan and its derivatives. Carbohydrate polymers. 2017 May 15;164:268-83 .
- 6 .Kanetkar P, Singhal R, Kamat M. *Gymnema sylvestre*: a memoir. Journal of clinical biochemistry and nutrition. 2007;41(2):77-81.
 - 7 .Vediyappan G, Dumontet V, Pelissier F, d'Enfert C. Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*. PloS one. 2013 Sep 11;8(9): e74189.
 - 8 .Chen XG, Lee CM, Park HJ. O/W emulsification for the self-aggregation and nanoparticle formation of linoleic acid modified chitosan in the aqueous system. Journal of agricultural and food chemistry. 2003 May 7;51(10):3135-9.
 - 9 .Beyki M, Zhavah S, Khalili ST, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Bayat M, Tabatabaei M, Mohsenifar A. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial crops and products. 2014 Mar 1; 54:310-9.
 - 10 .Wayne PA. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI document M27-A3,2008; 2nd edition .
 - 11 .Nazem H, Mohseni far A, Majdi S. Chitosan-myristate nanogel as an artificial chaperone protects neuroserpin from misfolding. Advanced Biomedical Research. 2016 Jan 1;5(1):170.
 - 12 .Bandara HM, Lam OL, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. Bacterial lipopolysaccharides variably modulate in vitro biofilm formation of *Candida* species. Journal of medical microbiology. 2010 Oct;59(10):1225-34.
 - 13 .Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001 Sep 1;45(9):2475-9.
- داشته اما نانوذله و اسانس به میزان ۵۰ و ۷۸ درصد قدرت مهار کنندگی دارند. بر طبق یافته ها در غلظت های ۰/۵۸ ، ۱/۱۷ و ۲/۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر از اسانس و نانوذله در مقایسه با کنترل اختلاف معناداری نداشته است ($P>0/05$). در غلظت های بالاتر از ۴/۶۸ میکروگرم در میلی لیتر میزان درصد مهار کنندگی و کاهش حجم بیوفیلم توسط نانواسانس انکپسوله در مقایسه با سایر گروهها نقش بارزی را نشان می دهد. نکته قابل توجه افزایش تاثیر مهاری موثرتر نانواسانس انکپسوله بر فرم بیوفیلمی در مقایسه با داروی ایتراکونازول در MBIC۵۰ می باشد. همچنین با افزایش غلظت نانوذله از غلظت ۹/۳۷ میکروگرم در میلی لیتر بر مهار فرم بیوفیلمی کاندیدا/ الیکنس تفاوت معناداری ملاحظه نگردید. با توجه به نتایج این تحقیق لزوم انجام مطالعات نوین جهت جایگزینی نانودارو های گیاهی در درمان عفونت های کاندیدیایی مقاوم به دارو پیشنهاد می گردد.

فهرست منابع

1. Prasad R, Nair R, Banerjee A. Emerging mechanisms of drug resistance in *Candida albicans*. Yeasts in Biotechnology and Human Health: Physiological Genomic Approaches. 2019:135-53.
- 2 .Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral diseases. 2008 Oct;14(7):582-90.
- 3 .Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. Journal of controlled release. 2004 Nov 5;100(1):5-28.
- 4 .Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 2003 Nov 10;4(6):1457-65 .
- 5 .Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal

- 16 .Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of endodontics*. 2010 Jun 1;36(6):1030-5.
- 17 .Tayel AA, Moussa S, Wael F, Knittel D, Opwis K, Schollmeyer E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *International journal of biological macromolecules*. 2010 Nov 1;47(4):454-7.
- Medicinal Plants on the Human Pathogenic Fungus *Candida albicans* Antifungal potential of Essential oil Nanoemulsions: Antifungal potential of Essential oil Nanoemulsions.... *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023 Jan 15;19(1):37-49.
- 25 .Karimi H, Bodaghi H, Rajaei A, Mojerlou S. Investigation of antifungal activity of nanoencapsulation of Thyme vulgaris essential oil against *Botrytis cinerea* in red shahroodi grape (*Vitis vinifera* cv. Red).
- 26 .Zhavesh S, Mohsenifar A, Beiki M, Khalili ST, Abdollahi A, Rahmani-Cherati T, Tabatabaei M. Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*. 2015 Jul 1;69 :251-6.
- 27.Arora DS, Sood H. In vitro antimicrobial potential of extracts and phytoconstituents from *Gymnema sylvestre* R. Br. leaves and their biosafety evaluation. *AMB express*. 2017 Jun 5;7(1):115.
28. Vedyappan G, Dumontet V, Pelissier F, d'Enfert C. Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*. *PloS one*. 2013 Sep 11;8(9):e74189.
- 14 .Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2003 Feb;149(2):353-62.
- 15 .Pieper JS, Hafmans T, Veerkamp JH, Van Kuppevelt TH. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects. *Biomaterials*. 2000 Mar 1;21(6):581-93.
- 18 .Rajaei A, Hadian M, Mohsenifar A, Rahmani-Cherati T, Tabatabaei M. A coating based on clove essential oils encapsulated by chitosan-myristic acid nanogel efficiently enhanced the shelf-life of beef cutlets. *Food Packaging and Shelf Life*. 2017 Dec 1; 14:137-45.
- 19 .Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. *Chinese journal of integrative medicine*. 2017 Mar 23:201-7.
- ۲۰ .Ing LY, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International journal of Biomaterials*. 2012(1):632698.
- ۲۱ Souza JM, Caldas AL, Tohidi SD, Molina J, Souto AP, Figueiro R, Zille A. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2014 Nov 24:691-8.
- 22 .Veetil VN, Chitra AV, Sulieman AME, P. JK. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Gymnema sylvestre* methanolic extract against catheter associated urinary tract infections and their anti-oxidant activity. *South Eastern European Journal of Public Health*. 2025 Jan 26;1090-9.
- 23 .David BC, Sudarsanam G. Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae). *Journal of Acute Disease*. 2013 Jan 1;2(3):222-5.
- 24 .Khoshbakht S, Taliei F, Bezdi KG, Gharakhlo S. Anti-fungal effects of Essential Oil and Nano-emulsion of some