

مقایسه بیان ژن CYP51A ایزوله های اسپرژیلوس فومیگاتوس در مقابل فلوکونازول و نانو فلوکونازول

محمد رضا صرافها^۱، سید جمال هاشمی هزاوه^{۲*}، ساسان رضایی^۲، منصور بیات^۱

چکیده

می‌باشد. این جنس دارای گونه‌های متنوعی است که انسان و دام در مواجهه مدام با آن‌ها می‌باشند (۱). بیش از ۹۵٪ عفونت‌های اسپرژیلوسی به حضور سه گونه اسپرژیلوس فومیگاتوس، اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس نایجر مربوط می‌باشد (۲). پرندگان نسبت به این عفونت حساس می‌باشند و تقریباً هر اندامی در پرندگی ممکن است گرفتار شود و اختلالات گوارشی، عصبی و یا تنفسی بوجود آورد اما در غالب موارد دستگاه تنفسی مورد تهاجم است. فرم مزمن بیشتر در پرندگان مسن رخ می‌دهد که در کالبد گشایی اغلب ندول‌های قارچی بر روی ریه‌ها و کیسه‌های هوایی دیده می‌شود (۳، ۴). امروزه آزول‌ها به دلیل سمیت کمتر کاربرد بیشتری در درمان انواع اسپرژیلوزیس دارند و در بین آزول‌ها فلوکونازول دارای سطح پایینی از سمیت است و غلظت بالایی از دارو در بزاق و مایع مغزی نخاعی ایجاد می‌شود. با این حال جدیداً این نگرانی ایجاد شده که استفاده وسیع از فلوکونازول در درمان و همچنین در امور زراعت و کشاورزی می‌تواند موجب مقاومت به این دارو شود، بطوری که شیوع مقاومت نسبت به آن افزایش یافته است (۵-۷). آزول‌ها از طریق مهار آنزیم لانسترول ۱۴آلفا دمتیلاز از تبدیل لانسترول به ارگوسترول جلوگیری کرده و در نتیجه موجب توقف رشد قارچ می‌شوند و سرانجام سلول می‌میرد. آنزیم لانسترول ۱۴آلفا دمتیلاز در قارچ توسط ژن CYP51A کد می‌شود. در مطالعات انجام شده، در گونه‌های اسپرژیلوس یکی از مکانیسم‌های مقاومت به آزول‌ها، بیان بیش از اندازه ژن CYP51A می‌باشد که

اسپرژیلوزیس عفونت قارچی فرصت طلب در انسان و حیوان می‌باشد. بیماری در طیور عمدتاً تنفسی است ولی سایر تظاهرات بیماری نیز اتفاق می‌افتد. محققین یکی از علل افزایش مقاومت دارویی در گونه‌های اسپرژیلوس را، افزایش بیان ژن CYP51A می‌دانند. هدف از این مطالعه مقایسه بیان ژن CYP51A ایزوله‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس جدا شده از طیور در مقابل فلوکونازول و نانو فلوکونازول بود. نانوذرات لیپوزومی فلوکونازول به روش هیدراسیون لایه نازک تهیه شد. مقدار ۵/۱۲ میلی‌گرم از پودر فلوکونازول را در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و سپس در ۶ میلی‌لیتر حلال آلی کلروفرم-متانول حل کردیم و لیسیتین و کلسترول به آن اضافه نمودیم. اندازه نانوذرات لیپوزومی فلوکونازول 88.9 ± 12.1 نانومتر و بار سطحی این نانوذرات -20.12 ± 1.88 میلی‌ولت بدست آمد. همچنین به منظور بررسی ساختار نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده کردیم. ۳۰ نمونه اسپرژیلوس فومیگاتوس از ندول‌های ریه طیور جمع‌آوری گردید. تست حساسیت دارویی به روش استاندارد Broth microdilution طبق NCCLS-M38A2 جهت بررسی MIC فلوکونازول و نانوفلوکونازول در مقابل ایزوله‌ها انجام شد. تعداد دو عدد از ایزوله‌های نشان-دهنده مقاومت بالا به داروی فلوکونازول را انتخاب و برای بررسی بیان ژن CYP51A به روش Real-time PCR استفاده کردیم. نتایج نشان داد، نانوفلوکونازول دارای مقادیر MIC پایین‌تری نسبت به فلوکونازول بود و در غلظت‌های پایین‌تری باعث مهار رشد ایزوله‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس گردید. بیان ژن CYP51A در ایزوله‌های تحت تیمار با فلوکونازول و نانوفلوکونازول نسبت به حالت بدون تیمار افزایش پیدا کرد و همچنین یک روند کاهشی در بیان ژن CYP51A در مواجهه با نانودارو در مقایسه با داروی نرمال مشاهده شد.

واژگان کلیدی: اسپرژیلوس فومیگاتوس، فلوکونازول، ژن CYP51A، نانوذره،

تست حساسیت دارویی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۳

مقدمه

اسپرژیلوس یکی از شایع‌ترین قارچ‌های ساپروفیت محیطی

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
sjhashemi9141@yahoo.com

(نانوزینو) قرار داده شد و نانو لیپوزوم فلوکونازول و نانو لیپوزوم بلانک (بدون اضافه کردن فلوکونازول) به روش هیدراسیون لایه نازک توسط این شرکت تهیه گردید. جهت تهیه لایه یا فیلم نازک، ابتدا مقدار ۵/۱۲ میلی گرم از پودر فلوکونازول وزن و در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل حل نموده و سپس در ۶ میلی لیتر حلال آلی کلروفرم-متانول (به نسبت ۱:۱) حل کردیم سپس ۵۱ میلی گرم لسیتین و ۵ میلی گرم کلسترول را وزن و به محلول حاوی حلال آلی فوق که دارو را در آن حل کرده بودیم اضافه نمودیم و روی همزن مغناطیسی قرار دادیم تا محلول یکنواخت و همگنی به دست آمد. مرحله بعد این محلول را در داخل بالن گلابی شکل ۵۰ سی سی استریل ریخته و به وسیله دستگاه تبخیر روتاری، لایه نازکی بر اثر تبخیر حلال آلی تحت شرایط خلاء تشکیل شد. در نهایت برای تهیه فرمولاسیون نهایی و تولید میکرومولسیون، تدریجا و مرحله مرحله مقدار کمی سوکروز را اضافه کرده و بهم زدیم، که لیپوزومها در محیط غلیظ تشکیل شوند و بارگیری دارو بالا رود و روی شیکر سعی کردیم فیلم لیپیدی کاملا هیدراته شود و پس از اضافه کردن همه سوکروز بالن را دوباره در دستگاه روتاری قرار دادیم که با دور ۱۷۰ rpm و در دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه هیدراته شود و میکرومولسیون تهیه گردد. سپس محلول حاصله را به وسیله همزنایزر کاهش سایز داده و در ادامه برای کاهش سایز بیشتر فرمولاسیون، از دستگاه پروب سونیکاتور یا همان اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه به صورت ۱۰ دقیقه روشن و ۱۰ دقیقه خاموش استفاده گردید (۱۴، ۱۵). برای به دست آوردن اندازه ذره‌ای، نانو ذرات لیپوزومی تهیه شده به وسیله دستگاه Malvern و با استفاده از تکنیک Photon (PCS) correlation spectroscopy مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت بررسی پتانسیل زتا (Zeta potential) نانوذرات تهیه شده، ۱۰۰۰ میکرولیتر از فرمولاسیون به ۵ میلی لیتر بافر

موجب افزایش آنزیم و عدم مهار آنها توسط آزولها می‌گردد (۸-۱۰). در چند دهه اخیر سیستم‌های متنوع دارورسانی مانند نانوذرات به عنوان ابزار فیزیکی برای تغییر و بهبود ویژگی‌های فارماکوکینتیک انواع مختلف مولکول‌های دارویی استفاده شده‌اند. همچنین پلیمرهای مختلفی در فرمولاسیون نانوذرات برای افزایش ویژگی‌های درمان و کاهش اثرات جانبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند از جمله این پلیمرها، لیپوزومها هستند که می‌توانند به عنوان حامل برای هر دو گروه داروهای هیدروفیلیک و هیدروفوبیک استفاده شوند (۱۱-۱۳). هدف از این تحقیق بررسی اثرات ضد قارچی نانولیپوزوم حاوی فلوکونازول و تأثیر آن در بیان ژن CYP51A ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس در مقایسه با فرم رایج فلوکونازول بود و اینکه بتواند مقاومت دارویی را نسبت به فلوکونازول کاهش دهد.

مواد و روش کار

جداسازی قارچ

تعداد ۳۰ نمونه از ندولها یا پلاک‌های سفید ریه طیور صنعتی مبتلا به علائم تنفسی و مشکوک به آسپرژیلوزیس جمع آوری گردید. ابتدا به کمک آزمایش مستقیم و کشت، آسپرژیلوزیس تشخیص و کشت‌های مشکوک به آسپرژیلوس فومیگاتوس جهت تعیین قطعی گونه در محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) کشت مجدد داده شد. سپس ایزوله‌های خالص از نظر مورفولوژی کلنی بررسی و همچنین با تکنیک اسلاید کالچر مورفولوژی کنیدا و شکل و ساختار کنیدیوفور به روش میکروسکوپیک شناسایی شدند و در نهایت هویت آنها به روش سکانس ژن بتا توبولین مورد تایید قرار گرفت.

تهیه فرمولاسیون نانو لیپوزوم فلوکونازول

پودر خام فلوکونازول (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany) در اختیار شرکت زیست شیمی آزما رشد

غلظت دارویی فلوکونازول و نانولیپوزوم فلوکونازول که قارچ در آن رشد قابل مشاهده ای نداشته باشد مورد بررسی قرار گرفت و نتایج قرائت گردید. جهت اطمینان از عدم مهار رشد قارچ توسط ذرات نانولیپوزوم، از نانو ذرات لیپوزوم بلانک (فاقد دارو) نیز در این تست استفاده گردید و هیچ اثر ضد قارچی مشاهده نشد. با توجه به ماهیت داده ها، از T-test برای آنالیز آماری نتایج استفاده شد ($P < 0.001$).

بررسی بیان ژن CYP51A

استخراج RNA

برای بررسی بیان ژن CYP51A تعداد دو عدد از ایزوله های آسپرژیلوس فومیگاتوس نشان دهنده مقاومت بالا به داروی فلوکونازول (ایزوله ۱ و ۲ با MIC یا حداقل غلظت دارویی بازدارنده ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر) انتخاب شد و از غلظت های sub MIC دو ایزوله مورد نظر در مقابل فلوکونازول و نانوفلوکونازول کشت انبوه داده شد. پس از رشد قارچ در محیط سابورو دکستروز براث، از روی محیط جمع آوری شده و به لوله فالكون استریل منتقل شدند. سپس کشت ها به وسیله PBS 10X شستشو داده شده و در دور $3000 \times g$ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از آن توده های قارچی را درون هاون چینی در داخل نیتروژن مایع آنقدر کوبیده تا به صورت پودر نرم و یکنواختی درآیند و سپس هرکدام وارد لوله فالكون استریل گشتند. برای استخراج RNA ایزوله ها از کیت RNAX-plus طبق پروتکل کیت استفاده شد. جهت بررسی حضور RNA و غلظت آن در نمونه ها و عدم وجود آلودگی به پروتئین، میزان ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده را با ۴۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل مخلوط و در دستگاه اسپکتوروفوتومتر قرار دادیم و جذب نوری (OD) آن در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

فسفات اضافه و با دستگاه Malvern بار سطحی، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بررسی گردید. به منظور بررسی ساختار نانوذرات لیپوزومی از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope) استفاده شد و با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ و ۴۰۰۰۰ برابر تصویر برداری انجام شد.

تست حساسیت دارویی

جهت بررسی حساسیت دارویی طبق پروتکل NCCLS-M38A2 از آب مقطر برای حل شدن پودر خام فلوکونازول استفاده شد. پس از انجام یک پیش آزمون با استفاده از محیط RPMI1640 رقت سریال از $1024 \mu\text{g/ml}$ تا $2 \mu\text{g/ml}$ از فلوکونازول و نانو فلوکونازول تهیه شد (۱۶). در این مطالعه تست حساسیت دارویی به روش استاندارد Broth Microdilution مطابق آنچه که در NCCLS-M38A2 آمده جهت بررسی و ارزیابی Minimum Inhibitory Concentration (MIC) داروی ضد قارچی فلوکونازول و نانو فلوکونازول در مقابل ایزوله های آسپرژیلوس فومیگاتوس و همچنین کاندیدا کروژنی (ATCC 6258) به عنوان کنترل استاندارد استفاده گردید (۱۳). طبق پروتکل استاندارد غلظت نهایی داروها به چاهک های میکروپلت ۹۶ خانه ای اضافه شد. سپس سوسپانسیون قارچی که طبق پروتکل، به میزان $5 \times 10^4 - 0.4 \times 10^4$ CFU/ml تهیه شده بود اضافه گردید. چاهک یازدهم شامل محیط کشت RPMI1640 ولی بدون دارو و سوسپانسیون قارچی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. چاهک دوازدهم شامل محیط کشت RPMI1640 و سوسپانسیون قارچی ولی بدون داروها به عنوان کنترل مثبت انتخاب شد. میکروپلت ها پس از مخلوط کردن ملایم به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. هر یک از ایزوله ها به صورت سری سه تایی مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، میکروپلت ها جهت تعیین MIC یا حداقل

ساخت c-DNA

به منظور ساخت c-DNA از روی RNAهای استخراج شده، از کیت PrimeScript RT reagent Kit ساخت شرکت Takara استفاده شد. c-DNAهای ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

طراحی پرایمرها

پرایمرها از روی ژن CYP51A و با توجه به سکانس آنها در ژن بانک (NCBI) طراحی شدند و توسط شرکت سینا کلون (تهران، ایران) ساخته شدند. از ژن β -actin به عنوان ژنی با بیان ثابت (Housekeeping gene) به منظور نرمال سازی و تعیین صحت عملکرد و بیان ژن CYP51A استفاده شد. توالی پرایمرها به شرح زیر است:

Primer Sense (CYP51A-S1): 5' TGC GGCAATGGCTGAGATTA 3'
 Primer Anti sense (CYP51A-As1): 5' AGCAGCATCTCGCTTCTTGT 3'
 Primer Sense (β -actin -S1): 5' ACGGTATTGTTTCCAAC TGGGAC 3'
 Primer Anti sense (β -actin- As1): 5' TGGAGCTTCGGTCAACAAA ACTGG 3'

انجام Real-time PCR

به منظور کنترل پرایمرهای طراحی شده، بعد از استخراج DNA از ایزوله‌های اسپرژیلوس، یک آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای سنتز شده انجام و محصول فرایند PCR به مدت ۳۰ دقیقه بر روی ژل ۱٪ آگارز با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردیده و اندازه آن پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده حساسیت و ویژگی اختصاصی پرایمرها و پروتکل دمایی مورد استفاده برای انجام Real-time PCR مورد تایید قرار گرفت. در نهایت به منظور بررسی بیان ژن CYP51A از کیت تهیه شده از شرکت BIOFACT استفاده گردید. بعد از تهیه cDNA، با استفاده از پرایمرهای CYP51A Sense و CYP51A Antisense و همچنین β -actin

به عنوان House Keeping Gene. Real-time PCR انجام شد. به این ترتیب که میکروتیوب‌های مخصوص Real-time PCR را روی رک قرار داده و مواد استفاده شده به ازای یک نمونه شامل: Primer CYP51A-S به میزان ۰/۸ میکرولیتر، Primer CYP51A-As به میزان ۰/۸ میکرولیتر، Master mix ۱۰ میکرولیتر، Distilled Water ۶/۴ میکرولیتر و c-DNA ۲ میکرولیتر تحت شرایط کاملاً استریل به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. برای پرایمرهای β -actin نیز پروسه مثل پرایمرهای CYP51A طی گردید. برنامه زمانی و دمایی جهت انجام Real-time PCR به شرح زیر بود:

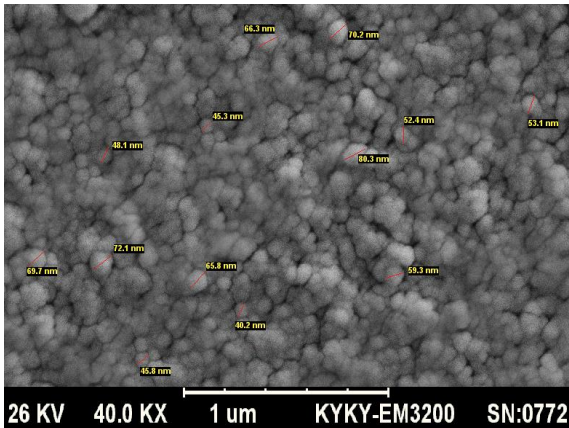
جدول ۱- برنامه زمانی و دمایی جهت انجام Real-time PCR

۱ سیکل	۳۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتیگراد
	۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتیگراد
۳۵ سیکل	۱۵ ثانیه	۶۰ درجه سانتیگراد
	۲۰ ثانیه	۶۰ درجه سانتیگراد

در این مطالعه برای آنالیز داده‌ها و ارزیابی نتایج Real-time PCR از نرم افزار REST 2009 استفاده شد.

نتایج

کلنی جدایه‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس در ابتدا رنگ سفید داشتند و به تدریج رنگ خاکستری مایل به سبز پیدا کردند. سطح کلنی چین‌دار و منظره مخملی و نمدی داشت. در بررسی میکروسکوپی کونیدیدفور کوتاه و وزیکول بطری شکل و در نصف یا یک سوم قسمت محدب انتهایی واجد یک ردیف فیالید بود و کونیدی‌های کروی شکل دیده می‌شد. بعد از استخراج DNA جدا شده از ایزوله‌های اسپرژیلوس و انجام PCR به منظور تکثیر و تقویت ژن بتا توبولین، تعیین توالی این ناحیه از ژن با توالی‌های موجود در

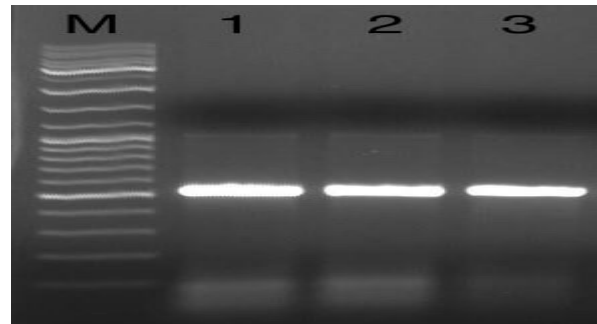


نگاره ۳- تصویر SEM لیپوزوم‌های حاوی فلوکونازول با بزرگنمایی زیاد (×۴۰۰۰۰)

میزان MIC داروهای فلوکونازول و نانو فلوکونازول به طور مجزا در مقابل ۳۰ ایزوله اسپرژیلوس فومیگاتوس در جدول ۲ نشان داده شده است.

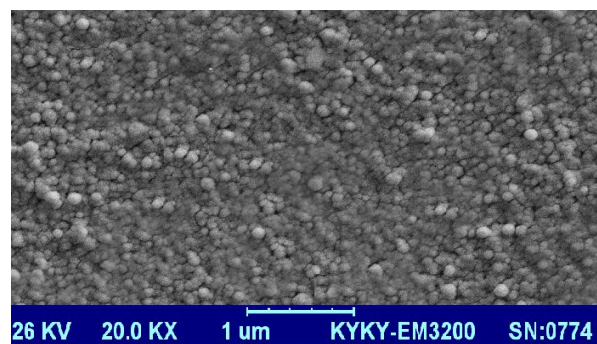
جدول ۳ نتایج کلی تست حساسیت دارویی ۳۰ ایزوله اسپرژیلوس فومیگاتوس را در برابر فلوکونازول و نانو فلوکونازول به صورت مجزا نشان می‌دهد. میانگین و ضریب انحراف خطای MIC فلوکونازول در برابر ایزوله‌ها $174/1 \pm 12/54$ و میانگین و ضریب انحراف خطای MIC نانو فلوکونازول در برابر ایزوله‌ها $71/68 \pm 6/98$ بدست آمد. این نتایج نشان دهنده توزیع نرمال داده‌ها و همچنین ارتباط معنادار بین دو دارو با سطح معناداری $P < 0/0001$ می‌باشد. همان گونه که در جدول مشاهده می‌شود نتایج MIC نانو فلوکونازول مقادیر پایین‌تری را در مقایسه با فرم معمول فلوکونازول دارند و این بیانگر میزان حساسیت بیشتر ایزوله‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس مورد بررسی نسبت به نانو فلوکونازول در مقایسه با فلوکونازول در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

بانک اطلاعات ژنتیکی (NCBI) با کمک نرم افزار BLAST، گونه‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس را مشخص نمود.



نگاره ۱- الکتروفورز محصول PCR (۱) کنترل مثبت (۲و۳) جدایه های اسپرژیلوس فومیگاتوس

اندازه ذره‌ای، نانو ذرات لیپوزومی فلوکونازول $88/9 \pm 12/1$ نانومتر و پتانسیل زتا این نانو ذرات $-20/12 \pm 1/88$ میلی ولت بدست آمد. نگاره ۲ تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی کمتر است که توزیع یکنواخت اندازه ذره‌ای نانولیپوزوم‌ها حاوی فلوکونازول را نشان می‌دهد. نگاره ۳ تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی بیشتر است که برای مشاهده بهتر ساختار و شکل نانولیپوزوم‌ها که کروی هستند تهیه شده است. در این تصویر قطر تعدادی از نانولیپوزوم‌ها مشخص شده که سایزهای بدست آمده از تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی مؤید نتیجه حاصل از اندازه ذره‌ای است که با روش PCS بدست آمد.



نگاره ۲- تصویر SEM لیپوزوم‌های حاوی فلوکونازول با بزرگنمایی کم (×۲۰۰۰۰)

جدول ۲- میزان MIC (µg/ml) داروهای فلوکونازول و نانو فلوکونازول علیه ایزوله‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس

شماره ایزوله	MIC فلوکونازول (µg/ml)	MIC نانو فلوکونازول (µg/ml)	شماره ایزوله	MIC فلوکونازول (µg/ml)	MIC نانو فلوکونازول (µg/ml)
۱	۲۵۶	۱۲۸	۱۶	۶۴	۶۴
۲	۲۵۶	۱۲۸	۱۷	۶۴	۶۴
۳	۲۵۶	۱۲۸	۱۸	۱۲۸	۶۴
۴	۲۵۶	۲۵۶	۱۹	۱۲۸	۱۲۸
۵	۱۲۸	۲۵۶	۲۰	۶۴	۱۲۸
۶	۱۲۸	۲۵۶	۲۱	۶۴	۱۲۸
۷	۱۲۸	۲۵۶	۲۲	۶۴	۶۴
۸	۱۲۸	۲۵۶	۲۳	۳۲	۶۴
۹	۲۵۶	۱۲۸	۲۴	۶۴	۶۴
۱۰	۱۲۸	۱۲۸	۲۵	۳۲	۶۴
۱۱	۱۲۸	۱۲۸	۲۶	۶۴	۶۴
۱۲	۱۲۸	۱۲۸	۲۷	۶۴	۶۴
۱۳	۱۲۸	۱۲۸	۲۸	۳۲	۳۲
۱۴	۲۵۶	۱۲۸	۲۹	۱۲۸	۳۲
۱۵	۱۲۸	۱۲۸	۳۰	۳۲	۳۲

جدول ۳- نتایج نهایی تست حساسیت دارویی ۳۰ ایزوله اسپرژیلوس فومیگاتوس در برابر فلوکونازول و نانوفلوکونازول

گونه اسپرژیلوس	ترکیب ضد قارچی	دامنه MIC (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	GM (µg/ml)
فومیگاتوس (تعداد = ۳۰)	فلوکونازول	۱۲۸-۲۵۶	۱۲۸	۲۵۶	۱۶۵/۰۳۹
	نانوفلوکونازول	۳۲-۱۲۸	۶۴	۱۲۸	۶۲/۵۳۸

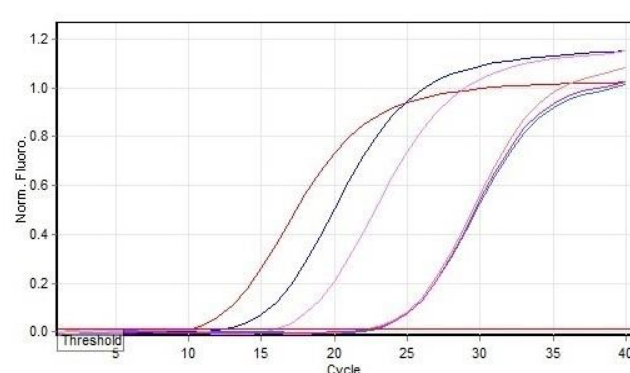
GM (Geometric Mean) = میانگین هندسی

نتایج حاصل از Real-time PCR در نمودار ۳، Threshold Cycle (Ct) سویه استاندارد اسپرژیلوس فومیگاتوس سیکل ۱۵/۹۹ را نشان می‌دهد. ایزوله مورد

تأثیر فلوکونازول و نانولپوزوم فلوکونازول در بیان ژن CYP51A

شده، بیان ژن CYP51A نسبت به سویه استاندارد آسپرژیلوس فومیگاتوس بدون تیمار روند افزایشی مشاهده شد. همچنین میزان بیان ثابت ژن β -actin بیانگر ثبات بیان این ژن و عدم تاثیر داروها بر بیان آن می باشد.

بررسی در مواجهه با نانو فلوکونازول سیکل ۱۲/۳۳ و در مواجهه با فلوکونازول سیکل ۱۰/۱۰ را نشان می دهند. نتایج بیان ژن CYP51A پس از استفاده از نرم افزار REST یک روند کاهشی را در بیان این ژن در مواجهه با نانو دارو در مقایسه با داروی رایج نشان داد. در هر دو حالت تیمار



نمودار ۳- میزان سیکل ژن CYP51A و ژن β -actin پس از Real-time PCR (از چپ به راست: ژن CYP51A: ۱. ایزوله شماره ۱ تحت تاثیر فلوکونازول ۲. ایزوله شماره ۱ تحت تاثیر نانو فلوکونازول ۳. سویه استاندارد - ژن β -actin: ۴. ایزوله شماره ۱ تحت تاثیر فلوکونازول ۵. ایزوله شماره ۱ تحت تاثیر نانو فلوکونازول ۶. سویه استاندارد)

جدول ۴- نتایج بیان ژن CYP51A در دو ایزوله آسپرژیلوس فومیگاتوس در مواجهه با فلوکونازول و نانوفلوکونازول به وسیله Real-time PCR آنالیز شده با نرم افزار REST

Gene	Type	Expression	95% C.I.	P(H1)	Result
β -actin	REF	۱/۰۰۰			
CYP51A (flu) No. 1	TRG	۲۹/۲۹۶	۲۹/۲۹۴ - ۲۹/۲۹۸	.	UP
CYP51A (Nano flu) No. 1	TRG	۴/۹۵۰	۴/۹۴۷ - ۴/۹۵۳	.	UP
CYP51A (flu) No. 2	TRG	۲۷/۱۵۵	۲۷/۱۵۲ - ۲۷/۱۵۸	.	UP
CYP51A (Nano flu) No. 2	TRG	۴/۱۸۷	۴/۱۸۵ - ۴/۱۸۹	.	UP

شماره ایزوله = No، فلوکونازول = flu، نانوفلوکونازول = Nano flu، ژن رفرنس = REF، ژن هدف = TRG، افزایش بیان ژن = UP،

احتمال فرضیه متناظر که تفاوت بین گروه نمونه و شاهد فقط به شانس است = P(H1)، بیان ژن = Expression

بحث

در مطالعه حاضر مشخص شد که نانو فلوکونازول علیه ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس جدا شده از ریه طیور مبتلا به علائم تنفسی در مقایسه با فرم طبیعی فلوکونازول موثرتر است. طبق جدول ۲، MIC بالایی برای فلوکونازول مشاهده شد مانند مقاومت بالای آسپرژیلوس به فلوکونازول که در مطالعات پیشین یافت شده بود (۱۷-۱۹). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود استفاده از فرم نانو فلوکونازول باعث کاهش معنادار MIC بر روی ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس ($P < 0.001$) شد. حقیقی و همکاران نیز در بررسی نانو ایتراکونازول (نانو ساختار مزوپوروس) فعالیت ضد قارچی مناسب‌تر این نانو دارو را در مقابل فومیگاتوس نشان دادند (۲۰). از آنجایی که میزان بیان ژن CYP51A در آسپرژیلوس فومیگاتوس در حضور داروهای ضد قارچی گوناگون، متفاوت است اگر یک دارو باعث افزایش بیان این ژن شود منجر به مقاوت به داروی مورد نظر می‌شود. بنابراین در این مطالعه پس از بررسی اثرات ضد قارچی داروهای مورد نظر، میزان بیان ژن CYP51A در دو ایزوله آسپرژیلوس فومیگاتوس تیمار شده با فلوکونازول و نانو داروی آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج Real-time PCR نشان می‌دهد در سویه استاندارد بدون تیمار بیان ژن CYP51A پایین است ولی بیان ژن مورد نظر در ایزوله‌های تحت تیمار با فلوکونازول و نانو فلوکونازول نسبت به حالت کنترل افزایش پیدا کرده است. همچنین بیان ژن مورد نظر در هر دو ایزوله تحت تیمار با نانو فلوکونازول، نسبت به تیمار با فلوکونازول کمتر است که نشان از حساس بودن ایزوله‌های مورد بررسی به نانو فلوکونازول و مقاوت به داروی فلوکونازول است. در سال ۲۰۱۰ Howard مطالعه‌ای

جهت بررسی مقاوت آزول‌ها در بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس برونکوپولمونری آلرژیک انجام داد. در نتایج بررسی، ۲ بیمار به داروهای آزولی مقاوت نشان دادند که مکانیسم مقاوت، موتاسیون در ژن CYP51A و افزایش بیان این ژن اعلام شد (۲۱). در سال ۲۰۰۷ Mellado در مطالعه‌ای برای بررسی میزان بیان ژن CYP51A بر روی ۱۴ استرین آسپرژیلوس فومیگاتوس اعلام کرد بیان ژن ۲ ایزوله مقاوم در مقابل داروهای آزولی در مقایسه با ایزوله استاندارد متفاوت بود (۹). در روش‌های نوین دارورسانی، می‌توان مقادیر کمی از ماده موثره را توسط حامل‌های مناسب، با حداقل عوارض و حداکثر کارایی به نقطه هدف رساند. استفاده از لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها برای تجویز دارو از طریق خوراکی، پوست، چشم و عروق خونی بررسی شده‌اند (۲۲، ۲۳). استفاده از نانو لیپوزوم‌ها دارای مزایای زیادی است. از جمله بهبود نفوذ و انتشار مواد فعال، انتقال انتخابی مواد فعال، افزایش زمان رهاسازی و پایداری بیشتر مواد فعال (۱۳). همچنین ذرات نانو می‌توانند حلالیت و نفوذ پذیری را افزایش و دوز دارو را کاهش دهند (۲۴). لیپیدها سمیت کمی دارند و توانایی لیوفیلیزه شدن دارند. نانوذرات لیپید به عنوان یک سیستم انتقال دارو، پایداری شیمیایی داروهای محصور شده را افزایش می‌دهند و اجازه می‌دهند تا داروها کنترل شده خارج شوند. علاوه بر این، حامل‌های ایمنی هستند که می‌توانند به راحتی در مقیاس بزرگ تولید شوند (۲۵). بعلاوه، گوپتا و همکاران اظهار داشتند که استفاده از لیپیدها نفوذ فلوکونازول را از طریق پوست افزایش می‌دهد (۲۶). نتایج MIC فلوکونازول در مقابل ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس اعداد بالایی را نشان داد همانطور که لئوناردلی مقاوت بالا و ذاتی آسپرژیلوس

1. Barnes PD. Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease. diagnosis. and treatment. Infectious disease clinics of North America. 2006;20(3):545-61.
2. Walsh TJ. Anaissie EJ. Denning DW. Herbrecht R. Kontoyiannis DP. Marr KA. et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases. 2008;46(3):327-60.
3. Khosravi A.R. Shokri H. Raeiat Yahya R. Veterinary Mycology. Tehran University; 1384.
4. Shadzi S. Medical Mycology. 2nd ed. Isfahan university; 1388.
5. Stevens DA. Lee JY. Analysis of compassionate use itraconazole therapy for invasive aspergillosis by the NIAID Mycoses Study Group criteria. Archives of internal medicine. 1997;157(16):1857-62.
6. Patton LL. Bonito AJ. Shugars DA. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2001;92(2):170-9.
7. Verweij PE. Snelders E. Kema GH. Mellado E. Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? The Lancet Infectious diseases. 2009;9(12):789-95.
8. Martel CM. Parker JE. Warrilow AGS. Rolley NJ. Kelly SL. Kelly DE. Complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* ERG11/CYP51 (Sterol 14 α -Demethylase) Doxycycline-Regulated Mutant and Screening of the Azole Sensitivity of *Aspergillus fumigatus* Isoenzymes CYP51A and CYP51B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010;54(11):4920-3.
9. Mellado E. Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L. Melchers WJG. Verweij PE. Cuenca-Estrella M. et al. A New *Aspergillus fumigatus* Resistance Mechanism Conferring In Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of *cyp51A*

فومیگاتوس را در مقابل فلوکونازول مطرح کرد (۲۷). همچنین عملکرد بهتر نانو فلوکونازول نسبت به فرم رایج دارو با نتایج پژوهش صرافها و همکاران در سال ۲۰۱۸ مطابقت دارد (۱۴). یکی از مکانیسمهای مقاومت دارویی آزولها، بیان بیش از اندازه ژن CYP51A می باشد که منجر به تولید بیش از اندازه آنزیم لانسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز می گردد و در نتیجه مقادیر بیشتری از دارو را جهت غیر فعال کردن کامل این آنزیم می طلبد. با بررسی نانو لیپوزومهای فلوکونازول مشاهده شد که تبدیل فرم نرمال فلوکونازول به ابعاد نانو علاوه بر اینکه موجب کاهش MIC شد باعث کاهش بیان ژن CYP51A نیز گردید که می تواند دلیلی بر افزایش حساسیت آسپرژیلوس فومیگاتوس در مقابل نانو دارو باشد. در این مطالعه هدف ما مقایسه بیان ژن CYP51A ایزوله های آسپرژیلوس فومیگاتوس جدا شده از طیور در مقابل فلوکونازول و نانو فلوکونازول بود. در این مطالعه مشاهده شد فرم نانو فلوکونازول باعث کاهش بیان ژن CYP51A نسبت به فرم رایج فلوکونازول گردید و اثرات ضد قارچی فلوکونازول را بهبود بخشید. به نظر می رسد خاصیت نانو ذرات و تغییر ماهیت ماده در ابعاد نانو و در فرمولاسیون لیپیدی، انکپسوله شدن فلوکونازول در نانو ذرات و ریلیز و رهاسازی کنترل شده و مستمر فلوکونازول بازگیری شده موجب کاهش بیان ژن CYP51A در ایزوله ها و شکسته شدن سد مقاومتی گردیده و تاثیر بهتری از داروی تغییر یافته جدید مشاهده گردید. به منظور اثرات واقعی درمانی نانو فلوکونازول و استفاده از این دارو در عفونت های ناشی از آسپرژیلوس فومیگاتوس مطالعات در شرایط *in vivo* لازم است.

فهرست منابع

- Alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(6):1897-904.
10. Fera MT, La Camera E, De Sarro A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert review of anti-infective therapy*. 2009;7(8):981-98.
 11. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *Journal of dental research*. 2010;89(11):1175-86.
 12. Chwalibog A, Sawosz E, Hotowy A, Szeliga J, Mitura S, Mitura K, et al. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *International journal of nanomedicine*. 2010;5(12):1085-94.
 13. Dua JS, Rana AC, Bhandari AK. Liposome: methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical studies and research*. 2012;3(2):14-20.
 14. Sarrafha MR, Hashemi SJ, Rezaei S, Bayat M. In vitro Evaluation of the Effects of Fluconazole and Nano-Fluconazole on *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* Isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2018;11(6):e57875.
 15. El-Nesr OH, Yahiya SA, El-Gazayerly ON. Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2010;18(4):217-24.
 16. John H. Rex, Barbara D. Alexander, David Andes, Beth Arthington-Skagges, Steven D. Brown, Vishnu Chaturveli, et al. M38A2-Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. *Clinical and Laboratory standards institute (CLSI)*. 2008;28(4):1-13.
 17. Azam F, Farideh Z, Parivash K, Seyed Jamal H, Mahmoud M, Mahin S. In Vitro Susceptibility of Aflatoxigenic and Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Strains to Conventional Antifungal Agents. *Acta Medica Iranica*. 2012;50(12):798-804.
 18. Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *Journal of infection*. 2000;41(3):203-20.
 19. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(6):2009-15.
 20. Haghighi F, Mohammadi SR, Khoobi M, Haririan I. Enhancing antifungal activity of itraconazole by mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2015;9(4):2771-81.
 21. Howard SJ, Pasqualotto AC, Denning DW. Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* bronchitis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(6):683-8.
 22. Swaminathan J, Ehrhardt C. Liposomal delivery of proteins and peptides. *Expert opinion on drug delivery*. 2012;9(12):1489-503.
 23. Vikaas B, Bhardwaj B, Choudhary M. Nanotechnology: Applications in pharmaceutical drug delivery systems. *Journal of chemical and pharmaceutical research*. 2016;8(8):259-65.
 24. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;47(2):165-96.
 25. Bose S, Du Y, Takhistov P, Michniak-Kohn B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;441(1):56-66.
 26. Gupta T, Patial V, Bali D, Angaria S, Sharma M, Chahota R. A review: Lumpy skin disease and its emergence in India. *Veterinary Research Communications*. 2020;44(3):111-8.
 27. Leonardelli F, Macedo D, Dudiuk C, Cabeza MS, Gamarra S, Garcia-Effron G. *Aspergillus fumigatus* Intrinsic Fluconazole

Resistance Is Due to the Naturally Occurring
T301I Substitution in Cyp51Ap.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
2016;60(9):5420-6.

