

شناسایی ویروس آنفلوانزا نوع A و B در کودکان مشکوک به عفونت تنفسی و بررسی

حنان خدایی^۱، لیلا عظیمی^{۲*}، نفیسه عبدالمهی^۳، شهناز آرمین^۴، مریم رجب نژاد^۵، میترا خلیلی^۶، جواد غروبی^۷

۱. دانش آموخته دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استاد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۶. استادیار، بیمارستان کودکان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۷. دانشیار، مرکز تحقیقات جراحی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: در فصول پاییز تا بهار هر سال شاهد عفونت دستگاه تنفسی با عوامل ویروسی متنوع هستیم. در پاندمی کووید-۱۹ بیشترین ویروس عامل عفونت دستگاه تنفسی ویروس SARS-COV-2 گزارش گردید ولی در فصول پاییز نمونه های مثبت با تایپ های متفاوت ویروس آنفلوانزا نیز گزارش شد. لذا هدف از این مطالعه بررسی فراوانی انواع شایع ویروس آنفلوانزا در نمونه های سواب نازوفارنکس کودکان مشکوک و به عفونت ویروسی تنفسی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه نمونه های سواب نازوفارنکس کودکان مشکوک به عفونت دستگاه تنفسی ویروسی که از آذر ۱۴۰۱ تا خرداد ۱۴۰۲ در بخش های مختلف بیمارستان کودکان مفید بستری بودند، وارد مطالعه گردید. سپس RNA کامل نمونه ها استخراج گردید. ویروس آنفلوانزا نوع A و B با استفاده از روش مولتی پلکس Real-Time PCR شناسایی شدند.

یافته ها: در این مطالعه مقطعی - توصیفی تعداد ۲۹۰۵ نمونه بیماران وارد مطالعه گردید. از این تعداد ۱۲۱ تست مثبت آنفلوانزا شامل ۱۸ نمونه مثبت آنفلوانزا A و ۱۰۳ نمونه مثبت آنفلوانزا B گزارش گردید. شایعترین علائم بالینی بیماران تب و بعد از آن سرفه بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ۴ درصد نمونه های نازوفارنکس کودکان بستری در بیمارستان کودکان مفید که مشکوک به عفونت تنفسی ویروسی هستند، برای آنفلوانزا مثبت گردید. از طرفی فراوانی آنفلوانزا نوع B در این کودکان در اولین زمستان و بهار پس از اتمام پاندمی کووید-۱۹ بیشتر از نوع A می باشد که در این رابطه مطالعات بیشتری برای اثر ابتلا به کووید-۱۹ و واکسیناسیون آن بر آنفلوانزا مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: آنفلوانزا، مولتی پلکس Real-time PCR، عفونت تنفسی ویروسی

Identification of influenza virus type A and B in children suspected of viral respiratory infection

Hannan Khodaei¹, Leila Azimi^{2*}, Nafiseh Abdollahi³, shahnaz Armin⁴, Maryam Rajabnejad⁵,
Mitra Khalii⁶, Javad Ghorubi⁷

1. Ph.D. degree student. Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Associate Professor. Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. MS degree student. Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Professor. Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Assistant Professor. Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. Assistant Professor. Mofid Children Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7. Pediatric Surgery Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and aim: Every year from autumn to spring, respiratory tract infections with various viral agents are present. In the COVID-19 pandemic, the SARS-COV-2 virus was the most common cause of respiratory tract infection, but positive samples with influenza virus were also reported. This study aimed to investigate the frequency of common types of Influenza virus in nasopharyngeal swab samples of children suspected of respiratory viral infection.

Material and methods: The nasopharyngeal swab of children suspected to viral respiratory tract infection, who were admitted to different wards of Mofid Children's Hospital from November 2022 to June 2023, were included. RNA extracted after samples processing. The Influenza virus A and B was detected by multiplex Real-Time PCR.

Results: In this descriptive cross-sectional study, 2905 patients were included in the study with age under 18 years old. Of these, 121 Influenza tests were positive, including 18 and 103 positive Influenza A and B, respectively. The most common clinical symptoms of the patients were fever, followed by cough.

Conclusion: The results of this study showed that 4% of the suspected children to viral respiratory infection were positive for different types of Influenza. On the other hand, the frequency of Influenza type B in children with symptoms of viral respiratory infection in the first winter and spring after the end of the COVID-19 pandemic is higher than type A, and in this regard, more studies are needed to determine the effect of COVID-19 infection and its vaccination on Influenza.

Key words: Influenza, Multiplex PCR, Respiratory viral infectio

مقدمه

سیاستگذاری های سالانه کمک کننده باشد تا آمادگی مناسبی جهت مواجهه با بیماران داشته باشند. این تعیین فراوانی برای برخی ویروس ها مانند آنفلوانزا که می تواند همه گیری های دوره ای نیز ایجاد کنند از اهمیت بیشتری برخوردار است (۱). با تعیین فراوانی بیماران عفونی شده با انواع ویروس های آنفلوانزا، سیاستگذاران بهداشتی می توانند در احتمال پیش آمدن همه گیری را زودتر و بهتر تشخیص دهند و آمادگی های لازم برای شرایط خاص همه گیری را مهیا کنند. لذا تعیین فراوانی این ویروس مخصوصاً در کودکان که آسیب پذیرتر می باشند از لازم و ضروری به نظر می رسد.

ویروس های آنفلوانزا متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده هستند و حاوی ژنوم RNA تک رشته ای می باشند. سه نوع ویروس آنفلوانزا A، B و C بر اساس آرایش ساختاری متفاوت آنتی ژن های نوکلئوپروتئین داخلی و پروتئین ماتریکس وجود دارد. آنفلوانزای A باعث بیماری شدیدتری می شود و از این رو به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲). آنفلوانزا B در کودکان کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است، اگرچه تأثیر آن قابل توجه است. آنفلوانزا C نیز به عنوان یکی از عوامل عفونت دستگاه تنفسی فوقانی در کودکان خردسال شناخته شده است. ویروس های آنفلوانزا B از سال ۱۹۸۳ در سراسر جهان در گردش بوده اند و باعث شیوع برخی همه گیری ها شده اند (۲). آنفلوانزا B معمولاً باعث بیماری خفیف تا متوسط در افراد سالم از جمله کودکان می شود. با این حال، بیماری شدید در کودکان، سالمندان و افراد مبتلا به بیماری های مزمن پزشکی گزارش شده است (۲).

ژن M ویروس آنفلوانزا، پروتئین های ماتریکس ۱ و ماتریکس ۲ را در این ویروس کد می کند. M1 فراوان ترین پروتئین در ذرات ویروس آنفلوانزا است و در ترکیب کپسید ویروسی نقش دارد. پروتئین غیرساختاری ۱ (NS1) نیز در چندین فرآیند تکثیر ویروس، بیماری زایی، گسترش و فرار از سیستم ایمنی ذاتی سلولی میزبان نقش دارد. ژن M در آنفلوانزا A و ژن NS1 در آنفلوانزا B در مطالعات مختلف و کیت های طراحی شده به عنوان هدف تشخیصی برای تشخیص آنفلوانزا به روش

آنفلوانزا یکی از شایعترین بیماری های عفونی تنفسی می باشد که در سراسر جهان به عنوان یک مشکل عمده بهداشت عمومی مطرح است. از طرفی ویروس آنفلوانزا می تواند عامل پاندمی های دوره ای باشد و تخمین زده شده است که آنفلوانزا فصلی سالانه تقریباً ۱ میلیارد نفر را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می دهد. در میان جمعیت کودکان، میزان عفونت آنفلوانزا به ۲۰ تا ۳۰ درصد گزارش شده است که به طور قابل توجهی بیشتر از بزرگسالان است (۱ و ۲).

در بیماران کودکان با سیستم ایمنی غیر طبیعی، پنومونی می تواند ناشی از انواع سوش های میکروبی از قبیل ویروس ها، باکتری / استرپتوکوک پنومونیه، باکتری های اتیبیک از قبیل ماکوپلازما پنومونیه، مایکوباکتریوم توبریکولوزیس و همچنین انواع قارچ ها از قبیل هیستوپلازما ایجاد گردد (۳-۵). در برخی از مطالعات گزارش شده است که عامل حدود ۹۰٪ پنومونی به خصوص در سال های اول زندگی، ویروس ها هستند (۶). از طرف دیگر، عفونت های ویروسی خود به تنهایی می توانند زمینه ساز بروز پنومونی های باکتریال نیز باشند (۷-۹). لذا تعیین میزان فراوانی عفونت های تنفسی ویروسی به ویژه در فصل هایی که شیوع نوع خاصی از آنها بیشتر می شود، بسیار می تواند به پزشکان و ماکز بهداشتی درمانی مانند بیمارستان ها در برنامه ریزی ها و

نویسنده ی مسئول:، دانشیار، مرکز تحقیقات

عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان،

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

ایران

آدرس الکترونیک:

leilaazimi1982@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۵/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۷/۰۳

مولتی پلکس Real-time PCR

جهت شناسایی ویروس آنفلوانزا ابتدا استخراج RNA کامل با استفاده از کیت های اختصاصی تجاری شرکت SIMBIOLAB (Lot No. 052-2326-010N100) انجام گرفت. در مرحله بعد با استفاده از کیت یک مرحله ای مولتی پلکس Real-Time PCR شرکت ژیوان زیست فناوری روژه (Cat. No. 512625051010169) شناسایی ویروس آنفلوانزای نوع A و B به تفکیک انجام شد. در این کیت شناسایی ویروس آنفلوانزا A با استفاده از ژن M و آنفلوانزا B با استفاده از ژن NS1 انجام می گیرد. همچنین از ژن RNaseP به عنوان کنترل داخلی جهت اطمینان از انجام صحیح مراحل استخراج و مولتی پلکس Real-Time PCR استفاده شد. جدول شرایط انجام مولتی پلکس Real-Time PCR در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

تعداد سیکل	زمان	دما	مراحل Real-Time PCR
۱	۲۰ دقیقه	۵۰ درجه سانتیگراد	سنتز cDNA
۱	۱ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد	واسرشت اولیه cDNA
۴۵	۱۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتیگراد	واسرشت cDNA
	۴۰ ثانیه	۶۰ درجه سانتیگراد	اتصال پرایمر و سنتز رشته جدید

جدول شماره ۱. شرایط انجام مولتی پلکس Real-Time PCR

روش آماری

در این مطالعه داده ها بصورت کیفی ارزیابی شده و فراوانی مورد های شناسایی شده با استفاده از درصد بیان می گردد. برای داده های مقایسه ای نیز با استفاده از

multiplex real-time PCR استفاده شده اند (۱۳-۱۰).

عوامل مستعد کننده کودکان برای ابتلا به پنومونی بر اساس ویژگی های جغرافیائی، فصلی و سن بیماران متفاوت بوده اما در این بین، ویروس سن سیشیال تنفسی (RSV)، رینوویروس انسانی (HRV) و ویروس های آنفلوانزا و پارآنفلوانزابه عنوان شایعترین ویروس های مرتبط با پنومونی کودکان مطرح هستند. همزمانی عفونت آنفلوانزا با عفونت باکتریایی زمینه ای با گسترش فوق العاده پنومونی در کودکان همراه می شود (۹ و ۱۴).

بعد از همه گیری کووید-۱۹ مطالعاتی در کشورهای مختلف برای بررسی فراوانی ویروس آنفلوانزا و تیپ های مختلف آن به خصوص در فصول شیوع این ویروس پس از این همه گیری انجام گرفت که اهمیت این قبیل مطالعات را نشان می دهد (۱۹ و ۱۶ و ۱۵). البته این مطالعات بیشتر برای بالغین بوده و در مورد کودکان بررسی های زیادی انجام نشده است. آنچه بسیار حائز اهمیت است. ارزیابی و پیش بینی وقوع عفونت های شایع دستگاه تنفسی ویروسی در بین کودکانی است که با تشخیص پنومونی در بیمارستان ها بستری شده اند. لذا هدف از این مطالعه بررسی فراوانی عفونت های ویروسی دستگاه تنفسی با عامل آنفلوانزا در کودکان با علائم تنفسی ویروسی بستری در بیمارستان مفید کودکان خواهد بود.

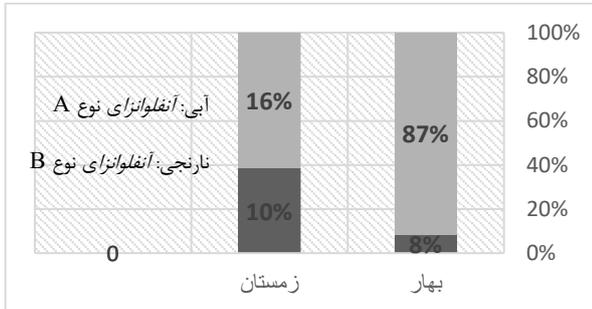
مواد و روش

نمونه ها

در این مطالعه در فاصله زمانی دی ماه ۱۴۰۱ تا خرداد ۱۴۰۲ نمونه سواب نازوفارنکس کودکان بین صفر تا ۱۸ سال بستری در بخش های مختلف بیمارستان کودکان مفید (مانند: عفونی، ریه، گوارش) که مشکوک به عفونت دستگاه تنفسی ویروسی بودند وارد مطالعه شد. نمونه ها بعد از جمع آوری در فالكون های حاوی محیط انتقال دهنده ویروسی بودند، به آزمایشگاه مرکز تحقیقات عفونی اطفال ارسال گردید. انجام تست نمونه ها بصورت روزانه انجام گرفت. اطلاعات مربوط به سن و جنس بیماران نیز با استفاده از پرسشنامه جمع آوری گردید.

نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط معناداری بین مثبت شدن نتایج تست آنفلوانزا و سن و جنس بیماران وجود ندارد ($p \text{ value} > 0.05$).

نتایج به تفکیک فصل نیز در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱. فراوانی ویروس آنفلوانزا نوع A و B به تفکیک فصل

نمونه ها از بخش های مختلف بیمارستان جمع آوری گردید ولی بخش عفونی، ریه و گوارش دارای بیشترین تعداد نمونه بودند. علائمی مانند: تنگی نفس، تب، لرز، سرفه، درد عضلانی، تهوع، استفراغ، اسهال و دل درد برای بیماران ثبت شده بود که بیشترین علامت تب و سرفه بود. در ۳ بیمار هر دو نوع A و B آنفلوانزا بطور همزمان شناسایی گردید.

لازم به ذکر می باشد اختلاف معناداری بین بروز علائم در نمونه های آنفلوانزا A و B مشاهده نگردید ($p \text{ value} > 0.05$).

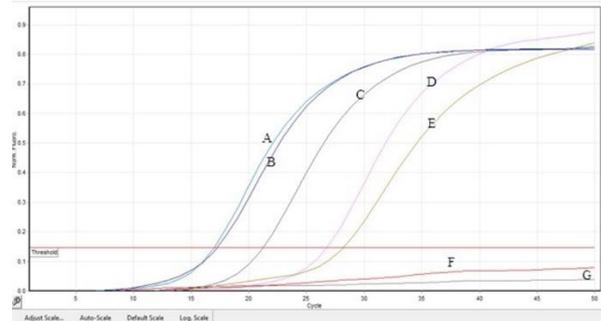
بحث

عفونت دستگاه تنفسی ناشی از عفونت ویروس آنفلوانزا یکی از علل شایع بستری شدن در بیمارستان در بین کودکان است. در موارد شدید، می تواند باعث نارسایی تنفسی، شوک سپتیک در بیماران گردد و یا حتی زندگی بیماران را تهدید کند. در مطالعه ای گزارش شده است که سالانه بیش از ۱۰۰۰۰ کودک ۵ ساله در سراسر جهان بر اثر عفونت دستگاه تنفسی مرتبط با ویروس آنفلوانزاجان خود را از دست می دهند که اکثر آنها کودکان مبتلا به عفونت تنفسی مرتبط با ویروس آنفلوانزاهستند که عفونت باکتریایی باعث پیچیده تر شدن شرایط بیماران شده است (۱). بنابراین، پزشکان باید به عفونت تنفسی با عامل

تعیین p value در آزمون T test بررسی انجام خواهد شد.

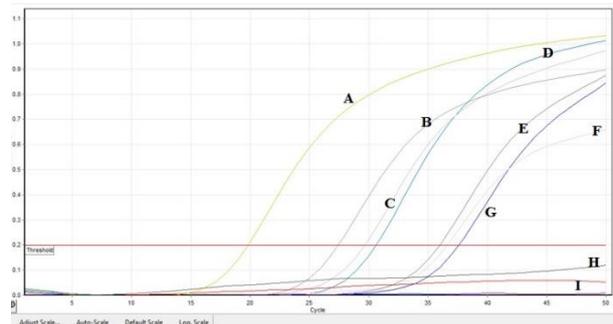
یافته ها

در این مطالعه مقطعی - توصیفی تعداد ۲۹۰۵ نمونه وارد مطالعه گردید که ۷۹۵ (۲۷ درصد) نمونه مربوط به فصل زمستان و ۲۱۱۰ (۷۳ درصد) نمونه مربوط به فصل بهار بود. در این مطالعه ۵۶ درصد مذکر و ۴۴ درصد مونث بودند. سن بیماران بین کمتر از یک سال تا ۱۸ سال بود. از این تعداد ۱۲۱ (۴ درصد) تست مثبت آنفلوانزا شامل نمونه ۱۸ (۱۵ درصد) نوع آنفلوانزا A و نمونه ۱۰۳ (۸۵ درصد) نوع آنفلوانزا B گزارش گردید (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱. منحنی تکثیر لگاریتمی برخی از نمونه های مثبت آنفلوانزا A

A: کنترل مثبت آنفلوانزا. نمودارهای B, C, D, E: نمونه های مثبت آنفلوانزا A. F: کنترل منفی. G: نمونه منفی



شکل ۲. منحنی تکثیر لگاریتمی برخی از نمونه های مثبت آنفلوانزا B

A: کنترل مثبت آنفلوانزا B. نمودارهای B, C, D, E, F, G: نمونه های مثبت آنفلوانزا B. I: کنترل منفی. H: نمونه منفی

ویروس آنفلوانزا نوع A را شایع تر از نوع B ذکر کردند مربوط به قبل از زمان پاندمی کووید-۱۹ می باشد و بعد از پاندمی گزارشی ثبت نشده است. ولی مطالعه حاضر گزارشی از فراوانی آنفلوانزا نوع A و B در کودکان در اولین زمستان پس از پاندمی کووید-۱۹ بعد می باشد. با توجه به اینکه بروز برخی از بیماری ها مانند میوکاردیت (۱۹ و ۱۸) و دیابت در کودکان (۲۱ و ۲۰)، شدت برخی از بیماری های ویروسی مانند آبله مرغان (داده ها چاپ نشده است). در اولین دوره خود پس از پاندمی کووید-۱۹ متفاوت می باشد. لذا بروز پاندمی کووید-۱۹ و واکسیناسیون آن شاید بتواند علت تفاوت در فراوانی نوع ویروس آنفلوانزا در کودکان باشد.

نتیجه گیری

ولی به طور کلی در سراسر جهان، کودکان خردسالی که در معرض آنفلوانزای نوع B قرار گرفتند در مقایسه با بزرگسالان، شدت بیماری بالاتری داشتند و باعث بروز عوارض قابل توجهی در کودکان در ایالات متحده طی سال های ۲۰۰۴-۲۰۱۱ و در بریتانیا در طول فصل های ۲۰۱۰-۲۰۱۱ شد.^۲ لذا باید شیوع بالای این نوع ویروس آنفلوانزا و میزان بیماریزایی آن را در کودکان در نظر گرفت.

منابع

1. Wang QU, Yuan L, Lin Jy, Zhuo ZQ, Wang YM, Li SS, et al. Clinical characteristics of severe influenza virus-associated pneumonia complicated with bacterial infection in children: a retrospective analysis. *BMC Infect Dis.* 2023;21:23(1):545. doi: 10.1186/s12879-023-08536-x.
2. Bhat YR. Influenza B infections in children: A review. *World J Clin Pediatr.* 2020;19:9(3):44-52. doi: 10.5409/wjcp.v9.i3.44.
3. Hardeep K, Gaurav M, Amrapali M, Vivek B. A case series of pneumonia beyond usual infections in children. *Journal of Pediatric Critical Care.*

ویروس آنفلوانزا و عفونت باکتریایی در کودکان، به ویژه در کودکان مبتلا به بیماری شدید توجه بیشتری داشته باشند (۱).

در مطالعه ای گذشته نگر در فنلاند که بر روی کودکانی که بین سال های ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۸ مبتلا به ویروس آنفلوانزا بودند، ۷۱/۴ درصد آنفلوانزا نوع A و ۲۸/۶ درصد آنفلوانزای نوع B گزارش گردید (۱۵).

در مطالعه ای که بر روی نمونه کودکان در سال های ۲۰۱۸ و ۲۰۱۷ انجام گرفت، نتایج نشان داد که ۷۹/۸٪ ویروس آنفلوانزای نوع A و ۲۰/۲ درصد نوع B گزارش گردید (۱۶). در مطالعه ای در تبریز که بر روی کودکان مراجعه کننده به بیمارستان کودکان بین سال های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۹ انجام گرفت، فراوانی ویروس آنفلوانزا نوع A ۸۰ درصد و نوع B ۲۰ درصد گزارش گردید (۱۷).

در مطالعه ای در استان گلستان در سال ۲۰۲۲ که بر روی فراوانی ویروس آنفلوانزا در بیماران مشکوک به عفونت های تنفسی ویروسی انجام گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که ۵۱ درصد بیماران آلوده به ویروس آنفلوانزا هستند که ۹۸ درصد آن متعلق آنفلوانزا نوع A بودند (۱۵). نتایج مطالعه دیگری در شیراز در سال ۲۰۱۶ و ۲۰۱۷ نیز مجدد فراوانی بیشتر ویروس آنفلوانزای A را نسبت به نوع B در بیماران مورد مطالعه نشان داد (۱۶).

در لبنان نیز مطالعه ای در سال های ۲۰۱۸ و ۲۰۲۲ مطالعه ای بر روی ویروس های عامل عفونت تنفسی ویروسی بر روی کودکان انجام گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد ۱۹/۷ درصد و ۱۱/۹ درصد آنها بیماران آلوده به ویروس آنفلوانزای A و B به ترتیب بودند (۱۷). در مطالعات ذکر شده در بالا فراوانی آنفلوانزای نوع A بیشتر از نوع B گزارش گردید، که این نتیجه بر خلاف نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر می باشد. این اختلاف می تواند به دلیل تفاوت در سال های مورد مطالعه باشد. زیرا در سال های مختلف عامل اپیدمی های فصلی آنفلوانزا می تواند متفاوت باشد.

از طرفی نکته قابل توجه ای که در تفاوت نتایج مطالعه حاضر با مطالعات ذکر شده می باشد به وجود آمدن پاندمی کووید-۱۹ می باشد. زمان تمام مطالعاتی که

- 10.3389/fped.2014.00077.
eCollection 2014.
5. EslamyHK, Newman B. Pneumonia in normal and immunocompromised children: an overview and update. *Radiol Clin North Am.* 2011;49(5):895-920. doi: 10.1016/j.rcl.2011.06.007.
 6. Sinaniotis CA. Viral pneumoniae in children: incidence and aetiology. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5(1): S197-S200. doi.org/10.1016/S1526-0542(04)90037-1
 7. Manohar P, Loh B, Nachimuthu R, Hua X, C Welburn S, Leptihn S. Secondary Bacterial Infections in Patients With Viral Pneumonia. *Front Med (Lausanne).* 2020;5:7:420. doi: 10.3389/fmed.2020.00420.
 8. Morris DE, Cleary DW, Clarke SC. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. *Front Microbiol.* (2017) 8:1041. doi: 10.3389/fmicb.2017.01041
 9. Wang H, Anthony D, Selemidis S, Vlahos R, Bozinovski S. Resolving viral-induced secondary bacterial infection in COPD: a concise review. *Front Immunol.* (2018) 9:2345. doi: 10.3389/fimmu.2018.02345
 10. Yi Y, Zhang H, An Y, Ze Chen. A Live Attenuated H1N1 Influenza Vaccine Based on the Mutated M Gene. *Vaccines* 2024; 12(7), 725. doi.org/10.3390/vaccines12070725
 11. Kim HJ, Jeong MS, Jang SB. Structure and Activities of the NS1 Influenza Protein and Progress in the Development of Small-Molecule Drugs. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(8), 4242; doi.org/10.3390/ijms22084242
 12. Malanoski AP, Lin B. Evolving Gene Targets and Technology in Influenza Detection. *Mol Diagn Ther.* 2013;18;17(5):273–286. doi: 10.1007/s40291-013-0040-9
 13. Kehl SC, Kumar S. Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. *2023;10(6):269-275,* DOI: 10.4103/jpcc.jpcc_39_23
 4. Jesenak M, Banovcin P, Jesenakova B, Babusikova E. Pulmonary manifestations of primary immunodeficiency disorders in children. *Front Pediatr.* 2014;25:2:77. doi: Clin Lab Med. 2009;29(4):661-71. doi: 10.1016/j.cll.2009.07.008.
 14. Mitchell T G Pratt, Tasnim Abdalla, Peter C Richmond, Hannah C Moore , Thomas L Snelling , Christopher C Blyth. Prevalence of respiratory viruses in community-acquired pneumonia in children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Child Adolesc Health.* 2022;6(8):555-570. doi: 10.1016/S2352-4642(22)00092-X.
 15. Pourmomen M, Younesian O, Hosseinzadeh S, Hosseini Alarzi SS, Pourmomen M, Joshaghani H. Frequency of Influenza Infection in Symptomatic Patients Suspected of Having COVID-19. *Iran J Med Microbiol* 2023;17(1): 112-116. doi: 10.30699/ijmm.17.1.112
 16. Farzi R, Pirbonyeh N, Kadivar MR, Moattari A. Prevalence of Influenza Viruses A and B, Adenovirus, Respiratory Syncytial Virus, and Human Metapneumonia Viruses among Children with Acute Respiratory Tract Infection. *Adv virol.* 2024;2024:1-9. doi.org/10.1155/2024/7613948
 17. Eid R, Sayad A, Samaan W, Salameh P, Farah RA. Prevalence of influenza A and B and respiratory syncytial virus infections before and during COVID-19 pandemic in the pediatric population in Lebanon: A retrospective study. *PLOS One.* 2025; e 20(6): e0325001. doi.org/10.1371/journal.pone.0325001
 18. Janna-Maija Mattila, Tytti Vuorinen , Terho Heikkinen. Comparative Severity of Influenza A and B

- Infections in Hospitalized Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2020 Jun;39(6):489-493. doi: 10.1097/INF.0000000000002610.
19. Machado CM, Souza ACMF, Romano CM, Freire WDS, Costa AA, Figueiredo WM, et al. Influenza A and B in a cohort of outpatient children and adolescent with influenza like-illness during two consecutive influenza seasons. *Braz J Infect Dis.* 2020;24(1):73-80. doi: 10.1016/j.bjid.2019.12.005. Epub 2020 Jan 15.
20. Abdinia B, Dastranji A, Abedini AA, Moghbel I, Mobayen G. The frequency and outcome of Influenza in children admitted to Tabriz children's training and treatment center in Northwest Iran During 2014-2019. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2023;45(3): 224-230.
21. SleemB, BitarRZF, ArabiM. Myocarditis in COVID-19: a focus on the pediatric population. *Am J Cardiovasc Dis.* 2023; 13(3): 138–151.
22. Aljohani OA, Arcilla L, Kaushik N, Cresalia NM, Li B, Edwell AA., et al. Myocarditis in children after COVID-19 vaccine. *Ann Pediatr Cardiol.* 2022; 15(3): 280–283. doi: 10.4103/apc.apc_135_21.
23. D'SouzaD, Empringham J, Pechlivanoglou P, Elizabeth M., Kohen E, Shulman R. Incidence of Diabetes in Children and Adolescents During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Netw Open.* 2023; 6(6): e2321281. doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.21281
24. Prosperi S, ChiarelliF. COVID-19 and diabetes in children. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2022;27(3):157-168.. doi: 10.6065/apem.2244150.075.

سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر لیپوزوم حاوی عوامل ضدبیوفیلم برای مبارزه با بیوفیلم‌های باکتریایی

آلاء امیری^۱، فخری سادات حسینی^{۲*}

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: ظهور دوران پسا آنتی‌بیوتیک و افزایش مقاومت ضد میکروبی، یکی از مهمترین بحران‌های جهانی سلامت محسوب می‌شود. در این میان، بیوفیلم‌های باکتریایی که جوامع ساختاریافته‌ای از باکتری‌ها درون یک ماتریکس پلیمری هستند، به عنوان عاملی کلیدی در بروز این بحران شناخته می‌شوند. این ساختارها به‌طور چشمگیری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بوده و درمان عفونت‌های مرتبط را با چالش مواجه کرده‌اند.

یافته‌ها: این مقاله مروری، پتانسیل سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر لیپوزوم را به عنوان راهبردی نوآورانه و امیدبخش برای مقابله با بیوفیلم‌های باکتریایی مورد بررسی قرار می‌دهد. لیپوزوم‌ها با دارا بودن ماهیت آمفی‌فیلیک، امکان محصورسازی همزمان طیف وسیعی از عوامل درمانی هیدروفیل و هیدروفوب را فراهم می‌کنند. سازگاری زیستی بالا، سمیت محدود و توانایی ذاتی آنها در ادغام با غشاهای باکتریایی، از مزایای کلیدی این نانوحامل‌ها به شمار می‌رود. این مرور، انواع پیشرفته لیپوزوم‌های مهندسی شده از جمله لیپوزوم‌های استیلث برای افزایش زمان گردش خون، لیپوزوم‌های هدفمند برای اتصال اختصاصی، و لیپوزوم‌های پاسخ‌دهنده به محرک برای رهایش کنترل شده دارو در محل عفونت را معرفی می‌کند. کارایی این فرمولاسیون‌ها در برابر پاتوژن‌های کلیدی گرم-منفی (مانند *سودوموناس آئروژینوزا*) و گرم-مثبت (مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین) به تفصیل مورد بحث قرار گرفته و شواهدی از افزایش نفوذ به بیوفیلم، بهبود اثربخشی ضد میکروبی و کاهش قابل توجه زیست‌توده بیوفیلم ارائه می‌شود.

نتیجه گیری: اگرچه چالش‌هایی از جمله نیاز به مطالعات بالینی بیشتر و درک بهتر برهمکنش با انواع باکتری‌ها وجود دارد، اما نتیجه‌گیری کلی حاکی از آن است که سیستم‌های لیپوزومی با قابلیت تطبیق‌پذیری بالا، پلتفرمی قدرتمند برای توسعه درمان‌های ضد بیوفیلم در آینده هستند و نویدبخش غلبه بر عفونت‌های مقاوم می‌باشند.

کلمات کلیدی: آنتی‌بیوتیک، بیوفیلم، لیپوزوم، نانوحامل

Liposome-Based Drug Delivery Systems of Anti-Biofilm Agents to Combat Bacterial Biofilms

Ala Amiri¹, Fakhrisadat Hosseini^{2*}

1. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Abstract

Back and aim: The emergence of the post-antibiotic era and the rise of antimicrobial resistance are considered one of the most critical global health crises. Within this context, bacterial biofilms—structured communities of bacteria embedded within a polymer matrix—are recognized as a key factor driving this crisis. These structures exhibit significant resistance to antibiotics, challenging the treatment of associated infections.

Results: This review article examines the potential of liposome-based drug delivery systems as an innovative and promising strategy to combat bacterial biofilms. Owing to their amphiphilic nature, liposomes enable the simultaneous encapsulation of a wide range of hydrophilic and hydrophobic therapeutic agents. High biocompatibility, limited toxicity, and their inherent ability to fuse with bacterial membranes are among the key advantages of these nanocarriers. This review introduces various types of engineered liposomes, including stealth liposomes for prolonged blood circulation, targeted liposomes for specific binding, and stimuli-responsive liposomes for controlled drug release at the infection site. The efficacy of these formulations against key Gram-negative (such as *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive (such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) pathogens is discussed in detail, providing evidence of enhanced biofilm penetration, improved antimicrobial effectiveness, and significant reduction of biofilm biomass.

Conclusion: Although challenges remain, including the need for further clinical studies and a better understanding of interactions with various bacterial species, the overall conclusion indicates that highly adaptable liposomal systems represent a powerful platform for the development of future anti-biofilm therapies and show promise in overcoming resistant infections.

Keywords: Antibiotic, Biofilm, Liposome, Nanocarrier

مقدمه

به یک سطح آغاز می‌شود، و به دنبال آن چسبندگی غیرقابل برگشت، توسعه کلونی‌های میکروبی و بلوغ که توسط quorum sensing میانجی‌گری می‌شود، رخ داده و در نهایت با پراکندگی برای ایجاد کانون‌های جدید عفونت به پایان می‌رسد (۲).

داروهای درمانی برای عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم همچنان به‌طور بحرانی کم هستند. در حال حاضر هیچ عامل ضد بیوفیلم تأییدشده‌ای برای استفاده بالینی وجود ندارد و توسعه آنتی-بیوتیک‌های جدید به مراتب از ظهور مقاومت عقب مانده است. درمان‌های متعارف آنتی-بیوتیکی اغلب شکست می‌خورند زیرا نمی‌توانند بدون ایجاد سمیت سیستمیک، به غلظت‌های موضعی کافی در محل بیوفیلم دست یابند. این واقعیت بر نیاز فوری به راهبردهای درمانی نوآورانه‌ای تأکید می‌کند که بتوانند به‌طور مؤثر زیرساخت مقاوم بیوفیلم را هدف قرار داده و مختل کنند (۱).

در این چارچوب، سیستم‌های تحویل داروی مبتنی بر فناوری نانو به عنوان مسیری امیدوارکننده برای غلبه بر موانع ایجاد شده توسط بیوفیلم‌ها، توجه قابل توجهی به دست آورده‌اند. در میان نانوحامل‌های مختلف، لیپوزوم‌ها (وزیکول‌های کروی متشکل از یک یا چند دولایه فسفولیپیدی) به عنوان حامل‌های قدرتمند شناخته می‌شوند. ماهیت آمفی‌فیلیک آنها امکان محصورسازی همزمان طیف گسترده‌ای از عوامل درمانی را فراهم می‌کند، به طوری که داروهای هیدروفیل در هسته آبی و داروهای هیدروفوب در درون غشاء لیپیدی جاسازی می‌شوند. یک مزیت عمده لیپوزوم‌ها در ساختار بیومیمتیک آنها نهفته است که ادغام با غشاهای باکتریایی را تسهیل می‌کند و در نتیجه تحویل دارو به سیتوپلاسم باکتری را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، لیپوزوم‌ها را می‌توان در فرمولاسیون‌های پیشرفته مختلفی مهندسی کرد، از جمله لیپوزوم‌های استیلث پلی‌اتیلنه برای گردش خون طولانی‌مدت، لیپوزوم‌های هدفمند (مانند ایمونولیپوزوم‌ها) برای هدفگیری اختصاصی، و لیپوزوم‌های پاسخگو به محرک که محموله خود را در پاسخ به محرک‌های خاص بیوفیلم مانند pH پایین یا آنزیم‌ها رها می‌کنند (۳).

کارایی آنتی-بیوتیک‌ها و عوامل ضدبیوفیلم محصورشده در لیپوزوم در برابر طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌های مهم پزشکی،

ظهور قریب‌الوقوع دوران پسا آنتی-بیوتیک که با افزایش مقاومت ضد میکروبی (AMR) مطرح شد، یکی از فوریترین بحران‌های سلامت جهانی محسوب می‌شود. هشداردهنده‌تر اینکه پیش-بینی می‌شود عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی-بیوتیک تا سال ۲۰۵۰ به عامل اصلی مرگ‌ومیر تبدیل شوند. یکی از عوامل بنیادین محرک این بحران، توانایی چشمگیر باکتری‌ها برای تشکیل بیوفیلم‌ها است. این بیوفیلم‌ها، جوامع ساختاریافته از سلول‌های باکتری هستند که در درون ماتریکسی از مواد پلیمری خارج سلولی محصور شده‌اند. این تجمعات چسبنده به سختی ریشه‌کن می‌شوند و تقریباً در ۷۰ تا ۸۰ درصد از تمام عفونت‌های میکروبی و همچنین اکثریت قریب به اتفاق عفونت‌های مزمن انسانی دخیل هستند (۱).

برخلاف هم‌تایان آزاد خود، باکتری‌های ساکن در بیوفیلم تحمل بسیار افزایش‌یافته‌ای در برابر عوامل ضد میکروبی نشان می‌دهند، به طوری که سطوح مقاومت آنها تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر است. این مقاومت چندعاملی است و از موانع فیزیکی ناشی از ماتریکس مواد پلیمری خارج سلولی که نفوذ آنتی-بیوتیک را محدود می‌کند، وجود زیرجمعیت‌های باکتریایی ناهمگون از نظر متابولیک، و یک ریزمحیط با گرادیان مواد مغذی و اکسیژن که می‌تواند فعالیت آنتی-بیوتیک را خنثی کند، سرچشمه می‌گیرد. علاوه بر این، تشکیل بیوفیلم یک فرآیند تنظیم‌شده است که با چسبندگی اولیه و برگشت‌پذیر باکتری‌ها

نویسنده ی مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی،

دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

آدرس الکترونیک: f.hosseini@alzahra.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۹/۰۸

محصولات زائد، نواحی فیزیولوژیک متمایزی ایجاد می‌کنند. سلول‌های نزدیک به سطح ممکن است از نظر متابولیک فعال باشند، در حالی که سلول‌های واقع در هسته عمیق‌تر که فقیر از مواد مغذی و اغلب هاپیوکسیک (کم‌اکسیژن) هستند، وارد حالت غیرفعال یا کند رشد می‌شوند. از آنجایی که اکثر آنتی‌بیوتیک‌های متعارف فرآیندهای سلولی فعال مانند سنتز دیواره سلولی یا ترجمه پروتئین را هدف قرار می‌دهند، اجازه انتشار سریع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جامعه میکروبی را فراهم نمی‌کنند. این امر، در کنار فشار انتخابی ناشی از غلظت‌های زیرکشنده آنتی‌بیوتیک که ممکن است به طور جزئی به بیوفیلیم نفوذ کند، ایجاد مقاومت ضد میکروبی را تسریع می‌نماید (۴).

در نهایت، بیوفیلیم‌ها دارای توانایی قابل توجهی برای فرار از سیستم ایمنی میزبان هستند. ماتریکس مواد پلیمری خارج سلولی به عنوان یک سپر فیزیکی عمل کرده، فاگوسیتوز باکتری‌ها توسط سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها را مختل می‌کند. علاوه بر این، باکتری‌های مرتبط با بیوفیلیم می‌توانند پروفاژیل آنتی‌ژنی خود را تغییر داده و پاسخ التهابی میزبان را سرکوب کنند که به آن‌ها اجازه می‌دهد در حالت مزمن و نهفته باقی بمانند و پاکسازی آن توسط سیستم ایمنی دشوار است (۴).

در پرتو این چالش‌ها، واضح است که راهبردهای مؤثر ضد بیوفیلیم باید به طور خاص برای غلبه بر این موانع طراحی شوند. یک عامل درمانی ایده‌آل نه تنها باید دارای فعالیت ذاتی ضد میکروبی باشد، بلکه باید توانایی نفوذ به ماتریکس پلیمری خارج سلولی، حفظ فعالیت در ریزمحیط منحصر به فرد بیوفیلیم، هدف قراردادن جمعیت‌های سلولی متابولیک متنوع و غیرفعال، و فرار از خنثی‌سازی توسط سیستم ایمنی میزبان را نیز دارا باشد (۳). این مجموعه از الزامات سبب توسعه سامانه‌های پیشرفته رهاسازی دارو شده است و در این میان، نانوحامل‌های مبتنی بر لیپوزوم به عنوان پلتفرمی امیدبخش برای برآوردن این خواسته‌ها مطرح شده‌اند.

لیپوزوم‌ها: ابزاری برای تحویل عوامل ضد بیوفیلیم

شامل هر دو گونه گرم-منفی و گرم-مثبت، نشان داده شده است. این مقاله مروری قصد دارد یک نمای جامع از پیشرفت‌های اخیر در سیستم‌های تحویل داروی مبتنی بر لیپوزوم ارائه دهد که برای مبارزه با بیوفیلیم‌های باکتریایی طراحی شده‌اند. به دقت کارایی فرمولاسیون‌های لیپوزومی مختلف، از انواع متعارف تا پاسخگو به محرک، در برابر پاتوژن‌های کلیدی گرم-منفی مانند سودوموناس آئروژینوزا و اش‌ریشیا کلی و همچنین تهدیدات گرم-مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های استرپتوکوک خواهیم پرداخت. در نهایت، این مرور قصد دارد پتانسیل عظیم نانوحامل‌های لیپوزومی را برجسته کند، در عین حال چالش‌ها و جهت‌گیری‌های آینده در نبرد مداوم علیه عفونت‌های حاصل از بیوفیلیم باکتریایی را شناسایی کند.

چالش ریشه‌کنی بیوفیلیم‌های باکتریایی

انعطاف‌پذیری بیوفیلیم‌های باکتریایی چالش مهمی ایجاد می‌کند که درمان‌های متعارف ضد میکروبی را تا حد زیادی بی‌اثر می‌سازد. این مقاومت نه ناشی از یک مکانیسم واحد، بلکه در نتیجه موانع درهم‌تنیده فیزیکی، زیستی و فیزیولوژیکی است.

نخست، سد فیزیکی ناشی از ماتریکس ماده پلیمری خارج سلولی به شدت نفوذ آنتی‌بیوتیک را محدود می‌کند. این داربست متشکل از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، DNA خارج سلولی و لیپیدها است و به عنوان یک جاذب عمل کرده و عوامل ضد میکروبی را به دام انداخته و خنثی می‌کند، قبل از آنکه بتوانند به غلظت بحرانی در هسته بیوفیلیم برسند. برای دستیابی به یک اثر درمانی علیه باکتری‌های محصور شده در بیوفیلیم، اغلب دوزهای دارویی تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از دوزهای مورد نیاز برای گونه‌های همسان آزاد ضروری است که این امر به طور قابل توجهی خطر سمیت برای بافت‌های غیرهدف و آسیب بافتی را افزایش می‌دهد (۴).

دوم، محیط ریز ناهمگن درون یک بیوفیلیم، طیفی از حالت‌های متابولیک ایجاد می‌کند. سلول‌های باکتریایی در یک بیوفیلیم یکنواخت نیستند؛ گرادین‌های مواد مغذی، اکسیژن و

بالینی به دست آورده‌اند که این امر، پتانسیل قابل توجه آن‌ها را برای درمان بیماری‌های عفونی تایید می‌کند (۳ و ۴).

انواع لیپوزوم‌ها برای درمان بیوفیلیم

لیپوزوم‌ها را می‌توان با اصلاح ترکیب، بار سطحی و عملکردشان برای غلبه بر موانع زیستی خاص و افزایش کارایی درمانی علیه بیوفیلیم‌ها، به انواع مختلفی مهندسی کرد. این انواع به‌طور کلی به صورت زیر دسته‌بندی می‌شوند (که در جدول ۱ خلاصه شده‌اند).

لیپوزوم‌های متعارف

نسل اول لیپوزوم‌ها، یعنی لیپوزوم‌های متعارف، از فسفولیپیدهای خنثی، کاتیونی یا آنیونی تشکیل شده‌اند که اغلب کلاسترول برای تثبیت دولایه در آن‌ها گنجانده می‌شود. در حالی که آن‌ها به‌طور مؤثر سمیت مرتبط با دارو را کاهش می‌دهند، کاربردشان به دلیل پاکسازی سریع از جریان خون توسط سیستم رتیکولوآندوتلیال پس از اپسونیزاسیون، محدود می‌شود. لیپوزوم‌های کاتیونی در بسیاری از مطالعات، فعالیت ضد بیوفیلیم بالاتری را در مقایسه با هم‌تایان خنثی یا آنیونی خود نشان داده‌اند که عمدتاً به دلیل جذب الکترواستاتیک بین لیپوزوم با بار مثبت و سطوح با بار منفی باکتری‌ها و ماتریکس بیوفیلیم است. این برهمکنش می‌تواند چسبندگی باکتریایی را کاهش داده و یکپارچگی بیوفیلیم را مختل کند (۵).

لیپوزوم‌های استیلث (PEG دار)

برای حل مشکل پاکسازی سریع لیپوزوم‌های متعارف، لیپوزوم‌های تثبیت‌شده استریکالی به نام "استیلث" توسعه یافتند. این لیپوزوم‌ها معمولاً با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) پوشانده می‌شوند که لایه‌ای محافظ ایجاد کرده و لیپوزوم را از اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز متعاقب آن توسط اپسونیزاسیون محافظت می‌کند. این PEGylation به‌طور قابل توجهی زمان گردش لیپوزوم را طولانی می‌کند و شانس رسیدن آن به بیوفیلیم هدف را افزایش می‌دهد. برای مثال، PEGylation، نفوذپذیری و ماندگاری بیوفیلیمی هر دو لیپوزوم کاتیونی و آنیونی را در برابر سودوموناس آئروژینوزا تقویت می‌کند. با این

چالش‌های ناشی از بیوفیلیم‌های باکتریایی، مستلزم راهبردهای نوآورانه تحویل دارو است که بتوانند به ماتریکس پلی‌مری خارج سلولی نفوذ کنند، عامل درمانی را محافظت نمایند و آن را به‌طور دقیق به جایگاه هدف برسانند. در میان نانو حامل‌های مختلف، لیپوزوم‌ها به‌عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین و گسترده‌ترین پلتفرم‌های مورد مطالعه برای درمان ضد بیوفیلیم، به دلیل ویژگی‌های ساختاری و عملکردی منحصربه‌فردشان، جایگاه برجسته‌ای دارند.

ساختار پایه و مزایا

لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کروی هستند که از یک یا چند دولایه فسفولیپیدی متحدالمرکز تشکیل شده‌اند که هسته‌ای آبی را احاطه کرده‌اند. این معماری آمفی‌فیلیک، سنگ بنای تطبیق‌پذیری آن‌هاست و امکان انکپسولاسیون همزمان داروهای آبدوست در فضای آبی داخلی و داروهای آب‌گریز را درون خود دولایه لیپیدی فراهم می‌کند.

این ساختار چندین مزیت حیاتی برای کاربردهای ضد بیوفیلیم به ارمغان می‌آورد: الف) سازگاری زیستی و تجزیه‌پذیری زیستی: لیپوزوم‌ها که از فسفولیپیدهای طبیعی یا مصنوعی تشکیل شده‌اند، عموماً غیرسمی و تجزیه‌پذیر هستند و خطر واکنش‌های نامطلوب را به حداقل می‌رسانند. ب) شباهت به غشاهای زیستی: شباهت آن‌ها به غشاهای سلولی، ادغام با غشاهای باکتریایی را تسهیل می‌کند و تحویل مستقیم آنتی‌بیوتیک‌ها به سیتوپلاسم باکتری و افزایش جذب دارو را ممکن می‌سازد. پ) محافظت از محموله: انکپسولاسیون، عوامل درمانی را از تخریب آنزیمی و غیرفعال‌سازی در محیط زیستی محافظت می‌کند و در نتیجه کارایی آن‌ها را حفظ می‌نماید. ت) کاهش سمیت: با محصورکردن داروها، لیپوزوم‌ها می‌توانند سمیت سیستمیک و عوارض جانبی ناشی از دوزهای بالای آنتی‌بیوتیک‌های آزاد مورد نیاز برای درمان عفونت‌های بیوفیلیمی را کاهش دهند. ث) افزایش نفوذ به بیوفیلیم: اندازه نانومتری و ویژگی‌های سطحی قابل تنظیم لیپوزوم‌ها به آن‌ها اجازه می‌دهد تا مؤثرتر از مولکول‌های داروی آزاد، به ساختار متخلخل ماتریکس بیوفیلیم نفوذ کنند. به دلیل این ویژگی‌های سودمند، چندین فرمولاسیون مبتنی بر لیپوزوم، تأیید نهادهای نظارتی مانند سازمان غذا و داروی آمریکا را برای استفاده

می‌توان از آن‌ها برای رهایش القاوی بهره برد. محرک‌های برونزاد، از جمله نور مادون قرمز نزدیک، اولتراسوند، یا میدان‌های مغناطیسی متناوب، امکان کنترل دقیق مکانی-زمانی را فراهم می‌کنند. برای مثال، لیپوزوم‌های حرارتی-حساس فعال‌شونده با مادون قرمز که حاوی توبرامایسین و یک عامل فتوترمال هستند، رهایش و کارایی آنتی‌بیوتیک را علیه بیوفیلیم‌های *Sordomonas آئروژینوزا* در پرتو تابش، افزایش می‌دهند (۵).

لیپوزوم‌های تغییرشکل‌پذیر (الاستیک)

برای کاربردهای موضعی که پوست را هدف می‌گیرند، لیپوزوم‌های متعارف ممکن است فاقد انعطاف‌پذیری لازم برای نفوذ مؤثر به لایه شاخی باشند. لیپوزوم‌های تغییرشکل‌پذیر که با کسسانی بالای غشا مشخص می‌شوند، برای غلبه بر این سد مهندسی شده‌اند. آن‌ها می‌توانند از منافذی بسیار کوچک‌تر از قطر خود عبور کنند و نفوذ عمیق‌تر به پوست و تحویل بهبودیافته عوامل ضد بیوفیلیم به لایه‌های درمی آلوده را ممکن می‌سازند (۴).

لیپوزوم‌های حبابی

لیپوزوم‌های حبابی نوعی تخصصی هستند که یک هسته گازی را در کنار داروی درمانی حمل می‌کنند. با اعمال اولتراسوند، حباب‌های گاز نوسان کرده و متلاشی می‌شوند و به‌طور فیزیکی لیپوزوم و ساختار بیوفیلیم را مختل کرده و منجر به رهایش کنترل‌شده دارو می‌شوند. این رویکرد در افزایش کارایی عواملی مانند پلی‌میکسین B علیه بیوفیلیم‌های *آسینتوباکتر بومانی* در ترکیب با میکروحباب‌های اولتراسوند، نویدبخش است (۵). با این حال، چالش‌هایی شامل ظرفیت پایین بارگیری گاز و رویه‌های آماده‌سازی پیچیده وجود دارد.

حال، یک محدودیت کلیدی، احتمال بروز حساسیت بیش از حد و غیرقابل تجزیه بودن PEG با جرم مولی بالا است که استفاده از آن‌ها را به پلیمرهای با وزن مولکولی پایین محدود می‌کند (۴).

لیپوزوم‌های هدفمند فعال

برای دستیابی به تحویل ویژه‌ی محل، می‌توان لیپوزوم‌ها را با بخش‌های هدفمندکننده‌ای مانند آنتی‌بادی‌ها (تشکیل ایمونولیپوزوم‌ها)، آپتامرها یا پپتیدها، از نظر سطحی عملکردی کرد. این لیگاندها، آنتی‌ژن‌ها یا گیرنده‌های خاص بیان‌شده روی باکتری هدف یا در ریزمحیط اطراف بیوفیلیم را تشخیص داده و به آن‌ها متصل می‌شوند. برای مثال، ایمونولیپوزوم‌های کونژوگه با آنتی‌بادی‌های ضد همولیزین برای تحویل هدفمند مونو نیترات ایزوسوربید به بیوفیلیم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* منجر به اثرات مهاری تقویت‌شده‌ای در مقایسه با فرمولاسیون‌های غیرهدفمند می‌شوند. برای جلوگیری از پاکسازی سریع، لیپوزوم‌های هدفمند اغلب PEG دار می‌شوند تا طول عمر با ویژگی‌یابی ترکیب شود (۵).

لیپوزوم‌های پاسخ‌دهنده به محرک

این کلاس پیشرفته از لیپوزوم‌ها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که محموله خود را در پاسخ به محرک‌های خاص داخلی (درونزاد) یا خارجی (برونزاد) رها کنند و در نتیجه سمیت خارج از هدف را به حداقل رسانده و زیست‌فراهمی دارو را در محل عفونت به حداکثر برسانند. ریزمحیط اطراف بیوفیلیم، محرک‌های درونزاد منحصربه‌فردی مانند pH پایین، سطوح بالای آنزیم‌هایی مانند فسفولیپاز A2، یا غلظت‌های بالای گلوکوتائین ارائه می‌دهد که

جدول ۱. انواع و ویژگی‌های لیپوزوم‌ها برای تحویل داروی ضد بیوفیلیم

نوع لیپوزوم	توضیح	مزایا	محدودیت‌ها
متعارف: کاتیونی، آنیونی، خنثی	دولایه غیراصلاح‌شده از فسفولیپیدهای باردار یا خنثی.	کاهش سمیت دارو؛ نسخه‌های کاتیونی برهمکنش تقویت‌شده با بیوفیلیم‌های با بار منفی را نشان می‌دهند.	پاکسازی سریع از گردش خون توسط اپسونیزاسیون؛ هدفمندسازی محدود.
استیلث (PEGylated)	لیپوزوم‌های پوشیده‌شده با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)	زمان گردش طولانی‌تر؛ کاهش اپسونیزاسیون	غیرقابل تجزیه‌بودن PEG با جرم مولی بالا؛ احتمال حساسیت‌زایی.
هدفمند فعال	اصلاح‌شده سطحی با بخش‌های هدفمندکننده (مانند آنتی‌بادی‌ها، آپتامرها)	ویژگی بالا برای اهداف باکتریایی یا بیوفیلیمی؛ تحویل موضعی بهبودیافته.	حذف سریع مگر اینکه به‌طور استریکی تثبیت شده باشند (مثلاً با PEG)
پاسخ‌دهنده به محرک	طراحی شده برای رهاسازی محموله در پاسخ به محرک‌های pH، آنزیم‌ها، نور، اولتراسوند	کاهش سمیت خارج از هدف؛ رهایش کنترل‌شده و تقویت‌شده دارو در محل بیوفیلیم.	محدودیت‌ها بسته به محرک متفاوت است (به عنوان مثال، نفوذ ضعیف بافتی نور فرابنفش)
تغییرشکل‌پذیر (الاستیک)	لیپوزوم‌های با کشسانی و انعطاف‌پذیری بالای غشا.	نفوذپذیری عالی پوست برای کاربردهای موضعی.	عدم پایداری در طول ذخیره‌سازی بلندمدت؛ احتمال نشت محموله.
لیپوزوم‌های حبابی	لیپوزوم‌هایی که یک حباب گازی را در کنار دارو انکپسوله می‌کنند.	ترکیدن القاشده توسط اولتراسوند برای رهایش کنترل‌شده و اختلال فیزیکی بیوفیلیم.	ظرفیت پایین بارگیری گاز؛ اندازه بزرگ؛ سنتز پیچیده.

لیپوزومی، محققان می‌توانند نفوذ دارو، پایداری و تحویل هدفمند را افزایش دهند و لیپوزوم‌ها را به یک بستر استثنایی در نبرد مداوم علیه بیوفیلیم‌های باکتریایی مقاوم تبدیل کنند.

به طور کلی، ماهیت ماژولار لیپوزوم‌ها اجازه می‌دهد تا طراحی آن‌ها برای غلبه بر موانع خاص عفونت‌های مرتبط با بیوفیلیم، به‌طور دقیق تنظیم شود. با انتخاب نوع مناسب سیستم

لیپوزوم‌های پاسخگو به محرک به طور استراتژیک برای بهبود هدف‌گیری و کنترل رهایش دارو به کار گرفته شده‌اند. به عنوان مثال، لیپوزوم‌های دارای حامل اکسیژن پرفلوردهگزان و یک حساس‌کننده نوری، هاپیوکسی وابسته به بیوفیلیم را کاهش می‌دهند و گونه‌های اکسیژن تولید کرده که منجر به ریشه‌کنی قابل توجه بیوفیلیم می‌شوند. فتوترایی پویا و حرارتی دوگانه با استفاده از لیپوزوم‌های حاوی کونژوگه فسفولیپید-پورفیرین نیز فعالیت قوی ضدبیوفیلیم را نشان داده است (۷). با این حال، نتایج وابسته به فرمولاسیون می‌باشد و باید این ملاک در نظر گرفته شود.

فرمولاسیون‌های استراتژیک برای بهره‌برداری از محیط منحصر به فرد میکروبی بیوفیلیم طراحی شده‌اند. محققان لیپوزوم‌های هوشمندی ایجاد کردند که در پاسخ به سطوح بالای فسفولیپاز (یکی از ویژگی‌های محل‌های عفونت سودوموناس آئروژینوزا) تجزیه می‌شوند. این لیپوزوم‌ها به طور همزمان آزیتورمایسین، یک کمک‌آنتی‌بیوتیک فعال شونده در هاپیوکسی و یک دهنده اکسیدنیتریک را در خود جای داده و با موفقیت حتی بیوفیلیم‌های مقاوم به آزیتورمایسین را از بین بردند. سایر رویکردهای نوآورانه شامل استفاده از نانوا آرکیئوزوم‌های قابل استنشاق (لیپوزوم‌های ساخته شده از لیپیدهای آرکی‌باکتریال) است که نفوذ سریع به بیوفیلیم و پایداری برای تحویل آزیتورمایسین را نشان می‌دهند. علاوه بر این، موفقیت ترکیب فناوری لیپوزومی با پلیمرهای طبیعی ثبت شده است. به عنوان مثال، جنتامایسین کپسوله در نانوذرات فسفاتیدیل کولین-کیتوسان و کلرگزیدین در هیدروژل‌های کیتوسان، مهار تشکیل بیوفیلیم بهتری را نسبت به اشکال آزاد آن‌ها نشان دادند (۸).

بیوفیلیم‌های اشرشیا کلی

باکتری اشرشیا کلی یک پاتوژن گسترده با تمایل به مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. راهبردهای لیپوزومی در مختل کردن بیوفیلیم‌های آن موثر بوده‌اند. برای مثال، رامنوزوم‌ها (لیپوزوم‌های حاوی سورفکتانت ضد میکروبی رامنولیپید) به طور موثر منجر به کاهش قابل توجه زیست توده بیوفیلیم باکتریایی می‌شوند. سیستم‌های لیپوزومی پاسخگو به محرک با موفقیت استفاده شده‌اند. برای مثال، لیپوزوم‌های حرارتی حاوی نقاط کوانتومی تنگستن سولفید و وانکومایسین متعاقب تابش

فرمولاسیون‌های لیپوزومی علیه بیوفیلیم‌های باکتریایی گرم منفی

بی‌تردید، باکتری‌های گرم-منفی به دلیل داشتن غشای خارجی حاوی لیپوپلی‌ساکارید، چالش مهمی در درمان ضد میکروبی محسوب می‌شوند. این لایه لیپوپلی‌ساکاریدی هم به عنوان یک تحریک‌کننده قوی سیستم ایمنی و هم به عنوان سدی نفوذناپذیر عمل کرده و سهم به‌سزایی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد. در نتیجه، پاتوژن‌های گرم-منفی بخش عمده‌ای از فهرست اولویت‌دار سازمان جهانی بهداشت از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را تشکیل می‌دهند (۲). نانوحامل‌های لیپوزومی به عنوان یک راهبرد امیدوارکننده برای غلبه بر این موانع پدیدار شده‌اند و تحویل دارو و اثربخشی آن را در برابر بیوفیلیم‌های مقاوم گرم-منفی بهبود می‌بخشند. بخش‌های زیر، پیشرفت‌های اخیر در برابر پاتوژن‌های کلیدی گرم-منفی را خلاصه می‌کند.

بیوفیلیم‌های سودوموناس آئروژینوزا

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن مقاوم به چنددارو است که به دلیل تشکیل بیوفیلیم‌های متراکم و سخت در عفونت‌هایی مانند عفونت‌های ریه در فیروز سیستمیک مشهور است. اثرگذاری فرمولاسیون‌های لیپوزومی مختلف در برابر بیوفیلیم‌های سودوموناس آئروژینوزا به طور گسترده‌ای مستند شده است.

لیپوزوم‌های متعارف فعالیت ضدبیوفیلیم قابل توجهی را نشان می‌دهند. لیپوزوم‌های کاتیونی فعالیت قوی ضد بیوفیلیم و ماندگاری بهبود یافته در بیوفیلیم را نشان می‌دهند، درحالی‌که لیپوزوم‌های آنیونی نفوذپذیری بیوفیلیم را بهبود می‌بخشند. این امر به احتمال زیاد به دلیل جاذبه الکتروستاتیک بین حامل‌های کاتیونی و ماتریکس بار منفی بیوفیلیم است. در تایید این موضوع، لیپوزوم‌های کاتیونی حاوی توبرامایسین، با یا بدون پپتید ضدبیوفیلیم، اختلال قابل توجهی در بیوفیلیم ایجاد می‌کنند. در مقابل، اثربخشی بالاتری برای جنتامایسین محصورشده در لیپوزوم‌های بار منفی گزارش شده که نشان می‌دهد اتصال سطحی قوی ذرات کاتیونی ممکن است گاهی مانع نفوذ عمقی شود (۶).

تداوم عفونت‌های مزمن است. نانوحامل‌های لیپوزومی به عنوان یک راهبرد امیدوارکننده برای غلبه بر مقاومت ذاتی این بیوفیلیم‌ها پدیدار شده‌اند که تحویل دارو را بهبود بخشیده، فراهمی زیستی عوامل کم‌حلالیت را افزایش داده و رویکردهای درمانی هدفمند و پاسخگو به محرک را ممکن می‌سازند.

بیوفیلیم‌های استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس، به‌ویژه انواع مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و واسطه حساس به وانکومایسین (VISA) آن، یک پاتوژن مهم است که مسئول مرگ و میر قابل توجهی می‌باشد. توانایی آن در تشکیل بیوفیلیم‌های قوی بر روی بافت‌ها و دستگاه‌های پزشکی، اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌های متعارف را به طور جدی بی‌اثر می‌کند. یک کاربرد اولیه لیپوزوم‌ها، غلبه بر پروفایل‌های فارماکوکینتیک ضعیف مربوط به عوامل ضدبیوفیلیم قوی است. برای مثال، پلاتنسیمایسین، یک آنتی‌بیوتیک قوی علیه باکتری‌های گرم-مثبت، از حلالیت کم و فارماکوکینتیک ضعیف رنج می‌برد. قرار دادن آن در لیپوزوم‌های تغییر یافته با مانوز، اثربخشی آن را در بدن موش‌های آلوده به MRSA بهبود بخشید و میزان بقا را افزایش داد (۱۳).

لیپوزوم‌های کاتیونی به ویژه به دلیل جاذبه الکتروستاتیکی آنها با ماتریکس بیوفیلیم با بار منفی، مؤثر هستند. لیپوزوم‌های کاتیونی حاوی آزیترومایسین، بالاترین فعالیت را در برابر هر دو سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلیم‌های MRSA در مقایسه با لیپوزوم‌های خنثی، تغییر شکل‌پذیر یا لیپوزوم‌های پروپیلن گلیکول نشان می‌دهند. این امر به بار سطحی مثبت و فعالیت ضد میکروبی ذاتی لیپید کاتیونی نسبت داده شد (۱۴). همچنین، لیپوزوم‌های بارگیری‌شده با ترکیبات طبیعی بربرین و کورکومین کاهش قابل توجهی در حداقل غلظت مهارکننده نشان می‌دهند و به طور مؤثر تشکیل بیوفیلیم MRSA را در شرایط آزمایشگاهی مختل می‌کنند، اثری که با داروهای آزاد مشاهده نمی‌شود (۱۵).

لیپوزوم‌های پاسخگو به محرک برای رهاسازی محموله خود در محل عفونت طراحی شده‌اند. محققان، وزیکول‌های چندلامله پاسخگو به pH ایجاد کردند که وانکومایسین را در محیط اسیدی باکتریایی سریع‌تر رها می‌کند. این فرمولاسیون MIC وانکومایسین را ۸ برابر کاهش داد و فعالیت ضدبیوفیلیم بهبود

مادون قرمز نزدیک، بیوفیلیم/شرشیا کلی را مختل می‌کنند (۹). اثربخشی فرمولاسیون‌های لیپوزومی می‌تواند وابسته به سویه باشد. به عنوان مثال، لیپوزوم حاوی آزیترومایسین، با یا بدون آنتی‌اکسیدان استیل سیستئین در برابر بیوفیلیم‌های/شرشیا کلی SA057 برتر از داروی آزاد است اما در برابر سویه SA10 اینگونه نیست. در نهایت، کپسوله کردن لیپوزومی توبرامایسین و توبرامایسین، فعالیت آن‌ها را در برابر/شرشیا کلی مقاوم به توبرامایسین به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (۱۰).

سایر پاتوژن‌های گرم-منفی مهم

باکتری آسینتوباکتر بومانی یک علت شایع عفونت‌های بیمارستانی، توسط چندین رویکرد لیپوزومی مورد هدف قرار گرفته است. لیپوزوم‌های TNL و TL با موفقیت علیه آسینتوباکتر بومانی مقاوم به توبرامایسین، استفاده شدند. ترکیب لیپوزوم‌های بارگذاری‌شده با پلی‌میکسین B و اصلاح-شده با کیتوسان با میکروحباب‌های اولتراسوند منجر به ریشه‌کنی تقریباً کامل باکتری‌های تولیدکننده بیوفیلیم می‌شود و از آنتی‌بیوتیک آزاد بهتر عمل می‌کند (۱۱). باکتری سالمونلا به عنوان یک پاتوژن مهم غذایی، با استفاده از لیپوزوم‌های حاوی ترکیبات طبیعی مورد هدف قرار گرفته است. برای مثال، ژرانیول لیپوزومی، بیماری‌زایی و چسبندگی سالمونلا تیپی را موثرتر از ترکیب آزاد مهار می‌کند. کارواکرول و تیمول آزاد به سرعت سالمونلا/تتریسیا را روی سطوح غیرفعال می‌کنند، اما ترکیب لیپوزومی آن‌ها به زمان تماس طولانی‌تری نیاز دارد که نشان‌دهنده نیاز به بهینه‌سازی سینتیک رهاپاش است (۱۲).

فرمولاسیون‌های لیپوزومی برای درمان بیوفیلیم‌های باکتری‌های گرم-مثبت

عفونت‌های ناشی از بیوفیلیم‌های باکتری‌های گرم-مثبت یک چالش بزرگ در محیط‌های بالینی محسوب می‌شوند، به‌ویژه به دلیل افزایش بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین. این پاتوژن‌ها از علل اصلی عفونت‌های پوست و بافت نرم، باکتری می و عفونت‌های مرتبط با ایمپلنت‌های پزشکی هستند (۱). تمایل باکتری‌های گرم-مثبت به تشکیل بیوفیلیم، درمان را به طور قابل توجهی پیچیده می‌کند، زیرا این امر یک عامل اصلی در

دارو شده و گونه‌های اکسیژن فعال تولید کرده که در نهایت منجر به ریشه‌کنی بیوفیلیم‌های VISA شد (۹). راهبردهای پیشرفته شامل درمان‌های فوتودینامیک (PDT) و فتوترمال (PTT) هستند. برای مثال، ساختارهای شبه لیپوزومی از کونژوگه‌های فسفولیپید-پورفیرین به طور مؤثر بیوفیلیم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را پس از تابش نور مادون قرمز از بین می‌برند.

پنومونیه دست یافتند که برای کاربردهایی مانند درمان اوتیت مدیا بسیار مهم است. برای بیوفیلیم‌های دهانی، محققان نشان دادند که اثربخشی عوامل ضدبیوفیلیم آنیونی مشروط به الکترولیت حامل است؛ بافرهای کاتیونی انتشار از طریق بیوفیلیم‌های با بار منفی استرپتوکوکوس اوریس و استرپتوکوکوس موتانس را تسهیل می‌کنند، درحالی‌که بافرهای آنیونی دفع می‌شوند (۱۸).

کوتی باکتریوم آکنه، باسیلوس سوبتیلیس و گونه‌های میکوباکتریوم: لیپوزوم‌های کاتیونی بارگیری شده با DNase I و پروتئیناز K نفوذ قابل توجهی در بیوفیلیم‌های کوتی باکتریوم آکنه دارند و به طور مؤثر از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کنند و اثربخشی خود را در بدن حفظ می‌نمایند. فرمولاسیون‌های لیپوزومی در برابر بیوفیلیم‌های میکوباکتریومی مقاوم موفق بوده‌اند. برای مثال، لیپوزوم حاوی سیپروفلوکساسین به طور قابل توجهی بیوفیلیم‌های میکوباکتریوم آبسوس و میکوباکتریوم/اویوم زیرگونه هومینیسویس را از بین می‌برند، در حالی که فرمولاسیون استنشاقی لیپوزومی آمیکاسین به طور مؤثر در بیوفیلیم‌های میکوباکتریوم/اویوم نفوذ کرده و سلول‌های زنده را کاهش می‌دهد. رامنوزوم‌ها (لیپوزوم‌های حاوی سورفکتانت زیست‌ساز رامنولیپید) حاوی باکتریوسین نسیین، بیوفیلیم‌های لیستریا مونوسیتوزنز (یک پاتوژن منتقله از غذا) را تا ۸۴ درصد در شرایط آزمایشگاهی مهار و کاهش می‌دهند (۱۹).

یافته در شرایط آزمایشگاهی و اثرات باکتریسیدی بالاتری در مدل عفونت پوستی MRSA در موش نشان داد (۱۶). محرک‌های خارجی، مانند نور مادون قرمز نیز به کار گرفته شده‌اند. محققان لیپوزوم‌های پاسخگو به نور مادون قرمز را طراحی کرده‌اند که به طور همزمان حاوی وانکومايسين و نقاط کوانتومی سولفید تنگستن هستند. پس از تابش، نقاط کوانتومی سولفید تنگستن گرما تولید می‌کنند، باعث رهاسازی

پاتوژن‌های گرم-مثبت دیگر

فراتر از *استافیلوکوکوس اورئوس*، فرمولاسیون‌های لیپوزومی علیه دیگر باکتری‌های گرم-مثبت مرتبط بالینی تشکیل‌دهنده بیوفیلیم امیدوارکننده نشان داده‌اند.

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس: این پاتوژن یکی از علل اصلی عفونت‌های مرتبط با بیوفیلیم بر روی ایمپلنت‌های پزشکی است. برای بهبود تحویل موضعی، لیپوزوم‌های بارگیری شده با تتراسایکلین و ترتینوئین در یک هیدروژل می‌توانند حداقل غلظت مهارکننده بیوفیلیم را کاهش دهند. همچنین، محققان دریافته‌اند که لیپوزوم‌های کاتیونی همزمان بارگیری شده با ریفامپین و استیل سیستئین به طور قابل توجهی بیوفیلیم‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* را از بین می‌برند. محققان تأکید می‌کنند که روش آماده‌سازی لیپوزوم بسیار مهم است، به طوری که لیپوزوم‌های موکسی فلوکساسین با بارگیری فعال، مهار و انکپسولاسیون بیوفیلیم بالاتری را در مقایسه با داروی آزاد نشان می‌دهند (۱۷).

گونه‌های استرپتوکوکوس: از لیپوزوم‌ها برای درمان بیوفیلیم‌های پاتوژن‌های اولویت‌دار مانند *استرپتوکوکوس پنومونیه* استفاده شده است. سیلوا و همکاران از لیپوزوم‌های تغییر شکل‌پذیر برای تحویل اندولیزین استفاده کردند و به رهایش پایدار و کاهش قابل توجه بیوفیلیم‌های *استرپتوکوکوس*

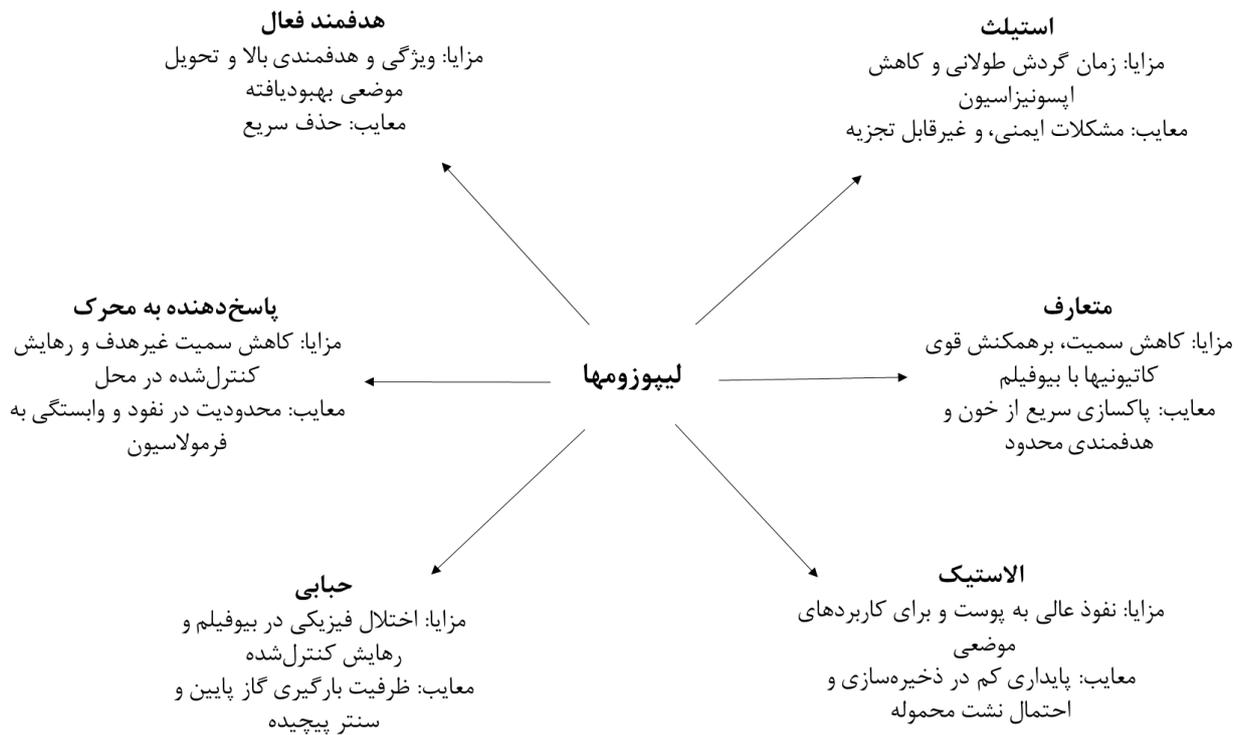
جدول ۲. خلاصه سیستم‌های تحویل داروی لیپوزومی علیه بیوفیلیم‌های باکتریایی گرم-مثبت

منابع	نتیجه کلیدی	ترکیب فعال	نوع لیپوزوم	سویه باکتری
-------	-------------	------------	-------------	-------------

منابع	نتیجه کلیدی	ترکیب فعال	نوع لیپوزوم	سویه باکتری
(۲۰)	لیپوزوم های گالاتوزیله شده فعالیت ضد بیوفیلم بالاتری با هدفگیری سنجش کوارتوم نشان دادند.	ترانس-رسوراترول	کاتیونی گلیکوزیله شده	MRSA
(۲۱)	بالاترین فعالیت ضد بیوفیلم به دلیل بار مثبت	آزیترومایسین	کاتیونی	MRSA
(۱۶)	رهایش سریع تر در pH پایین؛ کاهش ۸ برابری MIC و افزایش اثربخشی در بدن.	وانکومایسین	پاسخگو به محرک (pH)	MRSA
(۲۲)	هدفگیری مبتنی بر آنتی بادی، مهار تشکیل بیوفیلم را افزایش داد.	ایزوسورباید مونونیترات	ایمونولیپوزوم	<i>S. aureus</i>
(۲۳)	به طور مؤثر بیوفیلم ها را از بین برد؛ لیپوزوم حاوی ریفامپین امیدوارکننده ترین بود.	ریفامپین / ان-استیل سیستئین	کاتیونی	<i>S. epidermidis</i>
(۲۴)	به رهایش پایدار و کاهش قابل توجه بیوفیلم دست یافت.	اندولیزین MSlys	تغییر شکل پذیر	<i>S. pneumoniae</i>
(۲۵)	به ۸۵ درصد نفوذ در بیوفیلم دست یافت و از رشد بیوفیلم در بدن جلوگیری کرد.	DNase I / Proteinase K	کاتیونی	<i>C. acnes</i>
(۲۶)	جذب بیوفیلم و فعالیت در غلظت های پایین تر از پپتید آزاد را افزایش داد.	پپتید ضد میکروبی (Alpep7)	کاتیونی	<i>L. monocytogenes</i>

می کند. توسعه مداوم این نانوحامل های پیچیده، نوید قابل توجهی برای بهبود نتایج درمانی در برابر این عفونت های سرسخت دارد.

به طور خلاصه، تطبیق پذیری سیستم های لیپوزومی از طریق تعدیل بار، عملکردی شدن سطح و پاسخگویی به محرک های زیستی یا خارجی، آن ها را به یک پلتفرم قدرتمند برای مبارزه با چالش پایدار بیوفیلم های باکتریایی گرم-مثبت تبدیل



شکل ۱: انواع لیپوزوم و مزایای آنها برای تحویل عوامل ضدبیوفیلیم باکتریائی

چالش ها و چشم اندازها

خوبی درک نشده و نیازمند مطالعات مکانیکی تطبیقی است (۲۷).

از نظر چشم اندازها، آینده درمان بیوفیلیم مبتنی بر لیپوزوم، بر توسعه سامانه های نسل بعدی هوشمند متمرکز است. پژوهش های آتی باید طراحی لیپوزوم هایی را در اولویت قرار دهند که لیگاندهای هدف گیری فعال (مانند پادتن ها و آپتامرها) را با عناصر پاسخ دهنده به محرکها (مانند pH و آنزیمها) تلفیق می کنند تا آزادسازی دارو به صورت دقیق و مکانی-زمانی در محل بیوفیلیم میسر شود. ترکیب لیپوزومها با دیگر نانومواد، مانند نانوذرات اکسید آهن یا نقره، می تواند درمان قدرتمندی را ممکن سازد که هدف گیری آنتی بیوتیکی را با تخریب فوتوترمال یا فوتودینامیک همراه می سازد. در نهایت، غلبه بر موانع کنونی، نیازمند یک تلاش بین رشته ای هماهنگ برای استانداردسازی روش های ارزیابی، سنجش دقیق زیست سازگاری و گسترش مطالعات به پاتوزن های مهم خواهد بود تا بدین وسیله راه برای تبدیل این حامل های نانویی پیچیده

علیرغم نتایج امیدوارکننده، کاربرد بالینی راهبردهای لیپوزومی ضد بیوفیلیم با چالش های قابل توجهی روبرو است. یک محدودیت اصلی، اتکای شدید به داده های برون تنی است به عبارت دیگر، مطالعات درون تنی و بالینی برای تأیید اثربخشی در محیط های فیزیولوژیکی پیچیده به شدت کم هستند. افزون بر این، پژوهش های کنونی عمدتاً بر روی بیوفیلیم های تک گونه ای متمرکز شده اند و جوامع چندگانه ای که از نظر بالینی مهمتر هستند و در آنها تعاملات بین گونه ای می تواند نتایج درمانی را به شدت تغییر دهد، نادیده گرفته می شوند. بررسی های حیاتی در مورد سمیت سیستماتیک، هم سازگاری و ایمنوزنیستی این نانوفرمولاسیون ها نیز ناکافی است. مهم اینکه تأثیر بنیادی رنگ آمیزی گرم باکتری بر کارایی لیپوزوم اغلب نادیده گرفته می شود. تعاملات لیپوزومها با غشای خارجی غنی از لیپوپلی ساکارید در باکتری های گرم منفی در مقابل لایه ضخیم پپتیدوگلیکان در باکتری های گرم مثبت، هنوز به

به یک واقعیت بالینی در نبرد با عفونت‌های بیوفیلم مقاوم هموار گردد (۲۷).

نتیجه‌گیری

بیوفیلم‌های باکتریایی به عنوان یک چالش عمده در درمان عفونت‌ها، به دلیل مقاومت ذاتی و ساختار پیچیده‌شان شناخته می‌شوند. این مقاله مروری، پتانسیل قابل توجه سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر لیپوزوم را به عنوان یک راهبرد نوآورانه و امیدوارکننده برای غلبه بر این موانع برجسته می‌کند. با بهره‌گیری از مزایای منحصربه‌فردی مانند زیست‌سازگاری، قابلیت بارگذاری همزمان داروهای مختلف و قابلیت مهندسی سطح، لیپوزوم‌ها امکان تحویل هدفمند و کارآمد عوامل ضدبیوفیلم را به محل عفونت فراهم می‌کنند. توسعه لیپوزوم‌های پیشرفته‌تر مانند انواع پاسخگو به محرک و هدفمند، نویدبخش تحولی اساسی در نبرد مداوم علیه عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم و عبور از دوران پسا آنتی‌بیوتیک است.

تضاد منابع: تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان: نویسندگان به طور یکسان در تهیه این مقاله مشارکت داشته‌اند.

منابع

1. Bi Y, Xia G, Shi C, Wan J, Liu L, Chen Y, et al. Therapeutic Strategies against Bacterial Biofilms. *Fundamental Research*. 2021;1(2):193-212.
2. Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:676458.
3. Rukavina Z, Vanić Ž. Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. *Pharmaceutics*. 2016;8(2):18.
4. Wang Y. Liposome as a Delivery System for the Treatment of Biofilm-mediated Infections. *Journal of Applied Microbiology*. 2021;131(6):2626-39.
5. Kluzek M, Oppenheimer-Shaanan Y, Dadosh T, Morandi MI, Avinoam O, Raanan C, et al. Designer Liposomic Nanocarriers Are Effective Biofilm Eradicators. *ACS Nano*. 2022;16(10):15792-804.
6. Alhariri M, Majrashi MA, Bahkali AH, Almajed FS, Azghani AO, Khiyami M, et al. Efficacy of Neutral and Negatively Charged Liposome-Loaded Gentamicin on Planktonic Bacteria and Biofilm Communities. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:6949-61.
7. Cressey P, Bronstein L-G, Benmahmoudi R, Rosilio V, Regeard C, Makky A. Novel Liposome-like Assemblies Composed of Phospholipid-Porphyrin Conjugates with Photothermal and Photodynamic Activities against Bacterial Biofilms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;623:121915.
8. Hemmingsen LM, Giordani B, Pettersen AK, Vitali B, Basnet P, Škalko-Basnet N. Liposomes-in-Chitosan Hydrogel Boosts Potential of Chlorhexidine in Biofilm Eradication in Vitro. *Carbohydrate Polymers*. 2021;262:117939.
9. Xu M, Hu Y, Xiao Y, Zhang Y, Sun K, Wu T, et al. Near-Infrared-Controlled Nanoplatfrom Exploiting Photothermal Promotion of Peroxidase-like and OXD-like Activities for Potent Antibacterial and Anti-Biofilm Therapies. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020;12(45):50260-74.
10. Alarfaj RE, Alkhulaifi MM, Al-Fahad AJ, Aljihani S, Yassin AEB, Alghoribi MF, et al. Antibacterial Efficacy of Liposomal Formulations Containing Tobramycin and N-Acetylcysteine against Tobramycin-Resistant Escherichia Coli, Klebsiella Pneumoniae, and Acinetobacter Baumannii. *Pharmaceutics*. 2022;14(1):130.
11. Fu Y-Y, Zhang L, Yang Y, Liu C, He Y-N, Li P, et al. Synergistic Antibacterial Effect of Ultrasound Microbubbles Combined with Chitosan-Modified Polymyxin B-Loaded Liposomes on Biofilm-Producing Acinetobacter Baumannii. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:1805-15.
12. Engel JB, Heckler C, Tondo EC, Daroit DJ, da Silva Malheiros P. Antimicrobial Activity of Free and Liposome-Encapsulated Thymol and Carvacrol against Salmonella and Staphylococcus Aureus Adhered to Stainless Steel.

- International Journal of Food Microbiology. 2017;252:18-23.
13. Wang Z, Liu X, Peng Y, Su M, Zhu S, Pan J, et al. Platensimycin-Encapsulated Liposomes or Micelles as Biosafe Nanoantibiotics Exhibited Strong Antibacterial Activities against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection in Mice. *Molecular Pharmaceutics*. 2020;17(7):2451-62.
 14. Rukavina Z, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Vanić Ž. Azithromycin-Loaded Liposomes for Enhanced Topical Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Infections. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1-2):109-19.
 15. Bhatia E, Sharma S, Jadhav K, Banerjee R. Combinatorial Liposomes of Berberine and Curcumin Inhibit Biofilm Formation and Intracellular Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Infections and Associated Inflammation. *Journal of Materials Chemistry B*. 2021;9(4):864-75.
 16. Omolo CA, Hassan D, Devnarain N, Jaglal Y, Mocktar C, Kalhapure RS, et al. Formulation of PH Responsive Multilamellar Vesicles for Targeted Delivery of Hydrophilic Antibiotics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021;207:112043.
 17. Natsaridis E, Gkartziou F, Mourtas S, Stuart MCA, Kolonitsiou F, Klepetsanis P, et al. Moxifloxacin Liposomes: Effect of Liposome Preparation Method on Physicochemical Properties and Antimicrobial Activity against Staphylococcus Epidermidis. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):370.
 18. Harper RA, Carpenter GH, Proctor GB, Harvey RD, Gambogi RJ, Geonnotti AR, et al. Diminishing Biofilm Resistance to Antimicrobial Nanomaterials through Electrolyte Screening of Electrostatic Interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;173:392-9.
 19. Niaz T, Shabbir S, Noor T, Imran M. Antimicrobial and Antibiofilm Potential of Bacteriocin Loaded Nano-Vesicles Functionalized with Rhamnolipids against Foodborne Pathogens. *LWT - Food Science and Technology*. 2019;116:108583.
 20. Aiello S, Pagano L, Ceccacci F, Simonis B, Sennato S, Bugli F, et al. Mannosyl, Glucosyl or Galactosyl Liposomes to Improve Resveratrol Efficacy against Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Biofilm. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021;617:126321.
 21. Rukavina Z, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Vanić Ž. Azithromycin-Loaded Liposomes for Enhanced Topical Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Infections. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1-2):109-19.
 22. Zhang Y, Zhao Y, Dong D, Li X, Li Z, Li S, et al. Effects of Isosorbide Mononitrate Loaded Nanoparticles Conjugated with Anti-Staphylococcus Aureus A-toxin on Staphylococcus Aureus Biofilms. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019;19(2):1267-74.
 23. Bazrgari F, Khameneh B, Bazzaz BSF, Mahmoudi A, Bizhan M-N. Effect of the Nanoliposomal Formulations of Rifampin and N-Acetyl Cysteine on Staphylococcus Epidermidis Biofilm. *Nanomedicine Journal*. 2020;7(2):131-7.
 24. Silva MD, Paris JL, Gama FM, Silva BFB, Sillankorva S. Sustained Release of a Streptococcus Pneumoniae Endolysin from

- Liposomes for Potential Otitis Media Treatment. ACS Infectious Diseases. 2021;7(7):2127-37.
25. Fang J-Y, Chou W-L, Lin C-F, Sung CT, Alalaiwe A, Yang S-C. Facile Biofilm Penetration of Cationic Liposomes Loaded with DNase I/Proteinase K to Eradicate Cutibacterium Acnes for Treating Cutaneous and Catheter Infections. International Journal of Nanomedicine. 2021;16:8121-38.
26. Haney EF, Trimble MJ, Hancock REW. Microtiter Plate Assays to Assess Antibiofilm Activity against Bacteria. Nature Protocols. 2021;16(5):2615-32.
27. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. Frontiers in Pharmacology. 2015;6:286.

جداسازی و شناسایی قارچ های ساپروفیت موجود در هوا از مناطق مسکونی مناطق ۲۲ گانه تهران و خاک پارک های جنگلی و کارخانه های رنگ سازی

زهراشوقی^۱، فاطمه حیدری^۲، محدثه لاری پور^{۳*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست فناوری، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست فناوری، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳. دانشیار قارچ شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: ساپروفیت ها جمعیت کثیری از میکروارگانیسم های طبیعت را تشکیل می دهند و اسپور بسیاری از این قارچ ها به طور وسیعی سراسر دنیا پراکنده می باشد بطوریکه می توان گفت این قارچ ها در هوا، خاک و آب حضور فعال دارند. آن ها نقش مهمی در تغذیه و فرآیند هایی دارند که منجر به بهبود سلامت و رشد گیاه می شوند. از سوی دیگر این قارچ به محصولات کشاورزی آسیب میزنند و باعث بیماری های مشترکی بین انسان و حیوانات هستند. این رو شناسایی و مطالعه ی این قارچ ها بسیار مهم است.

مواد و روش ها: نمونه برداری از هوای منازل مسکونی و خاک پارک های جنگلی و کارخانه های رنگ سازی انجام شد. رقت سریال و خالص سازی و سپس مشاهده ی میکروسکوپی و ماکروسکوپی صورت گرفت. نمونه ها جهت تشخیص جنس و گونه ی آنها برای PCR برده شدند و با استفاده از تکنیک CTAB استخراج DNA صورت گرفت، همچنین پرایمر مورد استفاده در این واکنش ITS1 که پرایمر عمومی قارچ هاست انتخاب شد، سپس با استفاده از نرم افزار MEGA7 درخت فیلوژنی آنها رسم شد.

یافته ها: کلنی های خالص شامل قارچ های رشته ای شفاف و تیره بود، آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و کلادوسپوریوم اغلب این کلنی ها را تشکیل میدادند. نام جنس و گونه ی دقیق نمونه ها به ترتیب: *Aspergillus flavus*، *Penicillium chrysogenum*، *Aspergillus niger*، *Cladosporium limoniform* تشخیص داده شد. درصد فراوانی قارچ کلادوسپوریوم در منزل (دستشویی) بالاترین میزان (۵/۵۴٪) را به خود اختصاص داد و در کارخانه های رنگ سازی (۳۳/۵۳٪) و پارک های جنگلی (۸۰٪) قارچ آسپرژیلوس بیشترین درصد را داشت.

نتیجه گیری: با توجه به مطالعات انجام شده قارچ رشته ای اعم از گونه های آسپرژیلوس، گونه های پنی سیلیوم و گونه های کلادوسپوریوم جمعیت کثیری از نمونه های خاک، هوا و محیط زندگی اطراف ما را به خود اختصاص میدهند و از آنجایی که قارچ های ذکر شده در صنعت، زیست پالایی، ایجاد بیماری و آلرژی در انسان و حیوان به صورت مشترک نقش مهمی را ایفا میکنند، مطالعه و شناسایی این ساپروفیت ها از اهمیت بالایی برخوردار است.

کلمات کلیدی: ساپروفیت ها، آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، کلادوسپوریوم، پارک های جنگلی، کارخانه های رنگ سازی

Isolation and identification of saprophytic fungi present in the air from residential areas of 22 districts of Tehran and soil of forest parks and paint factories

Zahra Shoghi¹, Fatemeh Heydari², Mohaddeseh Larypoor^{3*}

1. Master's student, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch
2. Master's student, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch
3. Associate Professor of Mycology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

Abstract

Introduction: Saprophytes constitute a large population of microorganisms in nature, and the spores of many of these fungi are widely distributed throughout the world, so that it can be said that these fungi are actively present in the air, soil, and water. They play an important role in nutrition and processes that lead to improved plant health and growth. On the other hand, these fungi damage agricultural crops and cause common diseases in humans and animals. Therefore, identifying and studying these fungi is very important.

Materials and Methods: : Sampling was performed from the air of residential homes, soil of forest parks, and paint manufacturing factories. Serial dilution, purification, and subsequent macroscopic and microscopic examinations were carried out. The samples were then subjected to PCR for genus- and species-level identification, and DNA extraction was performed using the CTAB technique. The ITS1 primer, a universal fungal primer, was selected for amplification. A phylogenetic tree was subsequently constructed using MEGA7 software.

Results: : The purified colonies consisted of both hyaline and dematiaceous filamentous fungi, with *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Cladosporium* representing the most frequently isolated genera. The identified species were *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, and *Cladosporium limoniform*. The highest frequency of *Cladosporium* was observed in residential environments (bathrooms) (54.5%), while *Aspergillus* showed the highest prevalence in paint factories (53.33%) and forest parks (80%).

Conclusion: According to studies, filamentous fungi, including *Aspergillus* species, *Penicillium* species, and *Cladosporium* species, occupy a large population of soil, air, and living environment samples around us, and since the fungi mentioned play an important role in industry, bioremediation, and the creation of diseases and allergies in humans and animals, Studying and identifying these saprophytes is of great importance.

Keywords: Saprophytes, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, forest parks, paint factories

مقدمه

کربن و نیتروژن توسط میکروب های خاک امکان پذیر است (۱۶و۴). مواد مفید تولید شده توسط میکروارگانیسم ها به سلامت خاک، رشد گیاهان و تعادل بیولوژیکی حیات درسیاره ما کمک میکنند. آنها همچنین نقش مهمی در زنجیره های تغذیه ای که از این فرآیند ها پشتیبانی می کنند، ایفا می کنند. (۴، ۱۷و۱۸)، بیش از ۹۰ درصد از گونه های گیاهی خشکی زی، قارچ های میکوریزا را دارند که دریک رابطه ی سودمند متقابل، روی سیستم ریشه ی آنها رشد میکنند (۴، ۱۹ و ۲۰). فتوسنتز گیاه میزبان، قند هایی تولید می کند که قارچ آنها را با یون های ضروری فسفات و نیترات مبادله میکند (۴، ۲۱و۲۲). از سوی دیگر، برخی از این میکروارگانیسم ها برای انسان، حیوانات اهلی و محصولات گیاهی بیماری زا هستند (۱و۲۳). سطح برگ ها و میوه های گیاه محل زندگی چندین میکروارگانیسم از جمله قارچ های رشته ای و مخمر است که باعث فساد و خراب شدن سبزیجات و میوه ها می شوند. این امر قارچ ها رابه یک نگرانی با اولویت بالاتبدیل میکند زیرا گیاهان منبع غذایی برای مصرف کنندگان هستند و از اهمیت اقتصادی زیادی برای کشاورزان برخوردارند (۱۱، ۲۴و۲۵). قارچ های رشته ای را تحت کنترل داشته باشیم و از آسیب آنها به محصولات کشاورزی جلوگیری کنیم تعداد واقعی قارچ ها هنوز ناشناخته است (۱۱). درسال های اخیر، عفونت های قارچی فرصت طلب به طور قابل توجهی افزایش یافته اند و گونه های جنس آسپرژیلوس، موکور، پنیسیلیوم، ریزوپوس، فوزاریوم، آلترناریا و غیره به عنوان عامل انواع عفونت ها در انسان ظهور کرده اند (۱، ۲۶و۲۷). به دلیل تماس های مکرر انسان ها با خاک در طول زندگی و اهمیت بیماری های قارچی، آگاهی از پراکندگی و نوع قارچ ها در خاک هر منطقه مهم است. علاوه بر این، افزایش شیوع عفونت های جدی فرصت طلب ناشی از قارچ های غیربیماری زا و فرصت طلب در بیماران مبتلابه اختلال سیستم ایمنی در سال های اخیر، اهمیت شناسایی میکوفلور خاک را بیش از پیش آشکار میکند (۱و۲۸). درسال های اخیر، اهمیت ارگانیسم های قارچی ساپروفیت به عنوان آلرژن افزایش یافته است و قارچ های آلرژن از عوامل شناخته شده

خاک مخزن تعداد زیادی از میکروارگانیسم ها مانند باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها و تک یاخته ها است (۱و۲). میکروب های خاک باعث افزایش حاصلخیزی خاک می شوند؛ پایداری اکوسیستم را حفظ می کنند. (۱و۳). میکروارگانیسم ها از طریق تجزیه مواد آلی، بازیافت مواد مغذی و کنترل بیولوژیکی، تأثیر زیادی بر اکولوژی خاک دارند. ترکیب و عملکرد میکروبی، کیفیت خاک را تغییر میدهد (۴-۶) قارچ ها جزء مهمی از جانوران خاک هستند که معمولاً بسته به عمق خاک و شرایط تغذیه ای، بیشتر از باکتری ها زیست توده خاک را تشکیل میدهند. آنها از نظر جغرافیایی به طور گسترده در خاک، مشاهده شده اند (۱، ۷و۸). ساپروفیت ها جمعیت کثیری از میکروارگانیسم های طبیعت را تشکیل می دهند و اسپور بسیاری از این قارچ ها به طور وسیعی سراسر دنیا پراکنده می باشد بطوریکه می توان گفت این قارچ ها در هوا، خاک و آب حضور فعال دارند (۹و۱۰). رشد و توزیع قارچ ها تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی مختلفی مانند دما، pH، رطوبت، درجه هوادهی، مقدار و نوع مواد مغذی قرار میگیرد (۱۱و۱۲) آن ها نقش مهمی در تغذیه و فرآیند هایی دارند که منجر به بهبود سلامت و رشد گیاه می شوند (۱۱و۱۳). خاک مورد استفاده برای کشاورزی، محیطی پویا است که در آن میکروب ها و قارچ های مختلف مضر و بی ضرر در تماس نزدیک با هم وجود دارند (۴، ۱۴ و ۱۵). بازیافت

نویسنده ی مسئول: دانشیار، گروه میکروب

شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک:

m.larypoor@iaiu-tnb.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۸/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۹/۱۷

دلایل، در حال حاضر علاقه زیادی به شناسایی و توصیف میکروارگانیسم های موجود در خاک وجود دارد و چندین محقق از بسیاری از مناطق جهان، وجود طبیعی قارچ ها در خاک را مورد مطالعه قرار داده اند (۱، ۴۵-۴۲). دهه گذشته، بیشتر تحقیقات در ایران بر شیوع و جداسازی قارچ های کراتینوفیل از خاک مناطق مختلف ایران متمرکز بوده است (۱، ۴۶-۴۸)، با این حال، گزارش های کمی در مورد شیوع قارچ های ساپروفیت و بیماری زا در خاک موجود است (۱، ۴۹ و ۵۰). قارچ های ساپروفیت که اغلب هالوفیل اختیاری هستند به علت کشت آسان و تحمل شرایط خاص و دشوار می توانند مقادیر بالایی از آنزیم های خارج سلولی پر مصرف با پتانسیل صنعتی ایجاد کنند (۹، ۵۱ و ۵۲). همچنین به دلیل پتانسیل شان در زیست پالایی فلزات سنگین، به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته اند. قارچ ها دارای خواص جذب زیستی متنوعی هستند و ظرفیت رشد در شرایط نامساعد را دارند (۴، ۵۳ و ۵۴). از سوی دیگر تنها ۵ تا ۱۳٪ از کل گونه های قارچی ارزیابی شده در سراسر جهان شناسایی شده اند (۱۱ و ۵۵). بنابراین، جداسازی و شناسایی قارچ ها از منابع محیطی مختلف هنوز هم برای مشاهده و شناخت گونه های بیشتر، ویرایش طبقه بندی علمی، ارزیابی اثرات آنها در طبیعت و تهیه سویه ها برای اصلاح اکولوژیکی، کنترل بیولوژیکی و جنبه های صنعتی بسیار ضروری است (۱۱ و ۵۶). از این رو، مطالعات فعلی بر جداسازی و شناسایی سویه های قارچی از منابع طبیعی تمرکز دارند.

آرژنی، آسم و سینوزیت هستند (۲۹ و ۳۰). هوای اتمسفر چه در داخل و چه در خارج منزل حاوی انواع خاصی از عناصر قارچی و برخی هاگ های قارچی است اما غلظت قارچها با توجه به موقعیت مکانی، ارتفاع، زمان روز، فصل و شرایط آب و هوایی متفاوت هستند (۳۱ و ۳۲). قارچ های موجود در هوا از منابع بیولوژیکی و غیربیولوژیکی ناشی می شوند و می توانند به طور مستقیم یا غیرمستقیم به دستگاه تنفسی انسان منتقل شوند (۳۱، ۳۳-۳۵). تأثیر ذرات قارچی بر سلامت انسان با اندازه و خواص فیزیکی آنها مرتبط است (۳۱ و ۳۶). آلاینده های میکروبی در محیط های داخلی اغلب در گرد و غبار معلق وجود دارند و ممکن است باعث واکنش های ایمنی در افراد مستعد شوند (۳۱ و ۳۷). بسیاری از گونه های قارچی به عنوان عامل بیماری های آلرژیک توصیف شده اند و غلظت آنها مختص گونه است (۳۱ و ۳۸). اسپریلوس، آلترناریا و کلادوسپوریوم از جمله شایع ترین آلرژن ها هستند (۳۱ و ۳۹). اگرچه افراد مستعد ممکن است در مکان های مختلف آلوده شوند، باید توجه داشت که فضا های محیطی مختلف نقش مهمی در کمک به گسترش این عوامل، به ویژه در آب و هوای مرطوب نیمه گرمسیری دارند (۳۱ و ۴۰). علاوه بر این، مدت هاست که مشخص شده است تعیین کیفی قارچ های بازیابی شده از نمونه های محیطی مفیدتر از تعیین غلظت قارچ ها است (۳۱ و ۴۱). به همین دلیل، نگرانی ها در مورد اثرات بهداشتی قارچ ها ی موجود در هوا در محیط های مختلف، سال هاست که روبه افزایش است (۳۱). به همه این

روش کار

نمونه برداری

نمونه برداری از خاک و هوا، از مناطق ۲۲ گانه شهر تهران، فضای داخلی منازل مسکونی، پارک های جنگلی (سرخه حصار، پردیسان)، کارخانجات رنگ و باغ های اطراف تهران صورت گرفت. به منظور نمونه برداری از هوا پلیت های حاوی محیط پایه قارچی ساپرو دکستروز آگار^۱ (SDA) و پوتیتو

دکستروز آگار^۲ (PDA) به مدت ۳۰ دقیق در محل های مورد نظر قرار داده شد و پس از ته نشینی هوا، پلیت ها جمع آوری و به انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد در آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال منتقل شد و به مدت ۱۰ روز گرماگذاری صورت گرفت. به منظور نمونه برداری از خاک مناطق ذکر شده اعم از پارک های جنگلی سرخه حصار و پردیسان، مناطق ۲۲ گانه شهر تهران،

^۲Potato dextrose agar

^۱Sabouraud Dextrose Agar

بود. از پرایمر ITS1 و ITS4 که پرایمر عمومی قارچ هاست در این واکنش استفاده شد(۹).

کارخانجات رنگ و باغات اطراف تهران، با فالكون استریل ۵۰ میلی لیتر و قاشقک استریل به محل های ذکر شده مراجعه شد، ابتدا ۵ الی ۱۰ سانتی متر از خاک سطحی را کنار زده و با استفاده از قاشقک استریل از عمق ۵ الی ۱۰ سانتی متری خاک برداشت شد و بلافاصله به یخچال آزمایشگاه قارچ شناسی انتقال داده شد. به منظور کشت نمونه خاک، رقت های سریالی تهیه شد و با اضافه کردن ۱ میلی لیتر از رقت های تهیه شده به محیط های کشت پایه قارچی SDA و PDA و پخش نمودن آن در سطح پلیت به روش پور پلیت انجام شد، سپس نمونه ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد(۹).

خالص سازی و شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی

محیط های کشت SDA و PDA حاوی قارچ های رشد کرده، در مراحل متمادی به منظور خالص سازی و وجود تنها یک نوع کلنی در هر پلیت، پاساژ داده شد. پلیت های خالص شده، با توجه به استاندارد های موجود در منابع معتبر علمی مانند شکل ظاهری و بافت کلنی، رنگ سطح و پشت پلیت و نحوه رشد کلنی بررسی و مقایسه شد. از نمونه های قارچی لام میکروسکوپی مستقیم با رنگ آمیزی لاکتوفنل کاتن بلو تهیه و با عدسی ۴۰ بررسی شد. به منظور تشخیص دقیق ساختار زایشی قارچ، تکنیک اسلاید کالچر^۳ انجام شد(۹ و ۵۷).

شناسایی مولکولی

تمامی پلیت هایی که خالص شده بودند و رنگ آمیزی و اسلاید کالچر از آنها به عمل آورده شده بود ابتدا کشت تازه از آنها تهیه گردید سپس برای شناسایی قطعی جنس و گونه ی قارچ برای PCR برده شد. ابتدا از روش CTAB برای استخراج DNA استفاده شد. پس از استخراج نمونه ها برای نانودراپ برده شد و OD آنها خوانده شد تا میزان خلوص DNA ی استخراج شده تعیین گردد. سپس در جدول زیر مواد و مقادیر دقیق برای واکنش PCR با هم مخلوط شدند. میزان DNA ی مورد نیاز در ویال واکنش PCR نیز ۱ میکرولیتر بود. حجم کل ویال واکنش PCR ۱۵ میکرولیتر

جدول ۱. مقادیر و مواد مستر میکس برای واکنش PCR

آب مقطر	۱۰/۴ میکرولیتر
بافر	۱/۵ میکرولیتر
منزیم کلرید	۰/۵ میکرولیتر
نوکلوتید	۰/۵ میکرولیتر
پرایمر فوروارد	۰/۵ میکرولیتر
پرایمر ریورس	۰/۵ میکرولیتر
آنزیم Taq پلی مراز	۰/۱ میکرولیتر

جدول ۲. پرایمر های مورد استفاده در PCR

درصد	نقطه ی ذوب ریورس	پرایمر ریورس	درصد	نقطه ی ذوب فوروارد	پرایمر فوروارد	نام پرایمر	رفرنس
GC	۵۵/۰۹	TCCTCCGCTTATTGATATGC	GC	۵۵/۰۸	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS	Moghimiet al, 2017
٪ ۴۵	درجه سانتی گراد		٪ ۴۰/۹۱	درجه سانتی گراد			

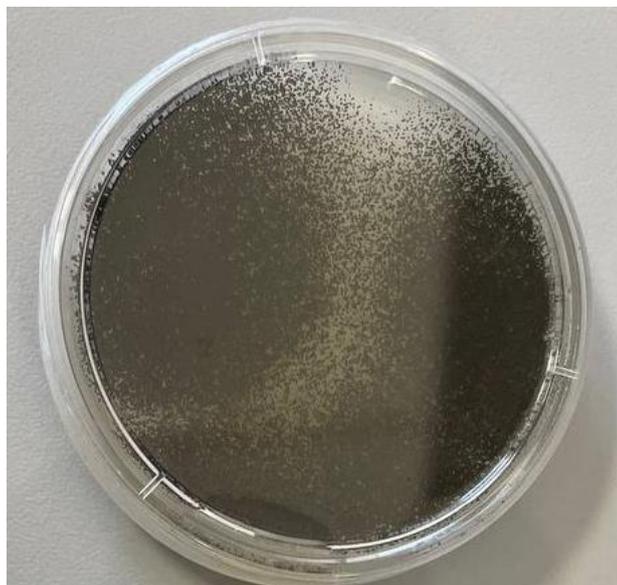
جدول ۳. برنامه ی دمایی واکنش PCR

ردیف	مراحل	تعداد سیکل	زمان	دما
۱	واسرشته سازی آغازین	۱	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه ی سانتی گراد
۲	واسرشته سازی	۳۰	۴۰ ثانیه	۹۵ درجه ی سانتی گراد
۳	اتصال پرایمر به رشته ی الگو	۳۰	۴۰ ثانیه	۵۲ درجه ی سانتی گراد
۴	گسترش سازی	۳۰	۴۰ ثانیه	۷۲ درجه ی سانتی گراد
۵	گسترش پایانی	۱	۵ دقیقه	۷۲ درجه ی سانتی گراد

دقیق جنس و گونه ارسال شد و پس از نتایج BLAST داده در پایگاه NCBI با نرم افزار MEGA7 درخت فیلوژنی آنها بر اساس maximum likelihood نیز رسم گردید.

پس از انجام واکنش PCR نمونه ها روی ژل آگارز بارگذاری شدند و پس از آن داخل دستگاه ژل داک از آنها عکس برداری شد. پس از آن نمونه ها به شرکت پیشگام جهت شناسایی

نتایج و یافته ها



شکل ۱. عکس سمت راست تصویر میکروسکوپی اسلاید کالچر اسپرژیلوس، عکس سمت چپ تصویر پلیت اسپرژیلوس



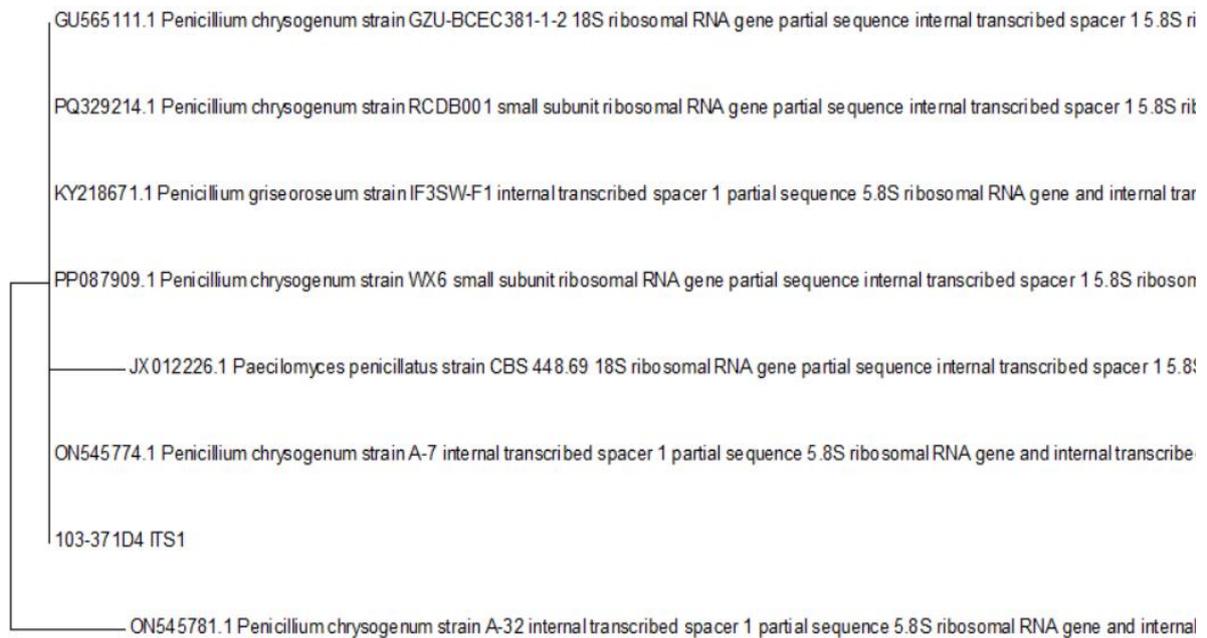
شکل ۲. عکس سمت راست تصویر میکروسکوپی اسلاید کالچر پنی سیلیوم، عکس سمت چپ تصویر پلیت پنی سیلیوم



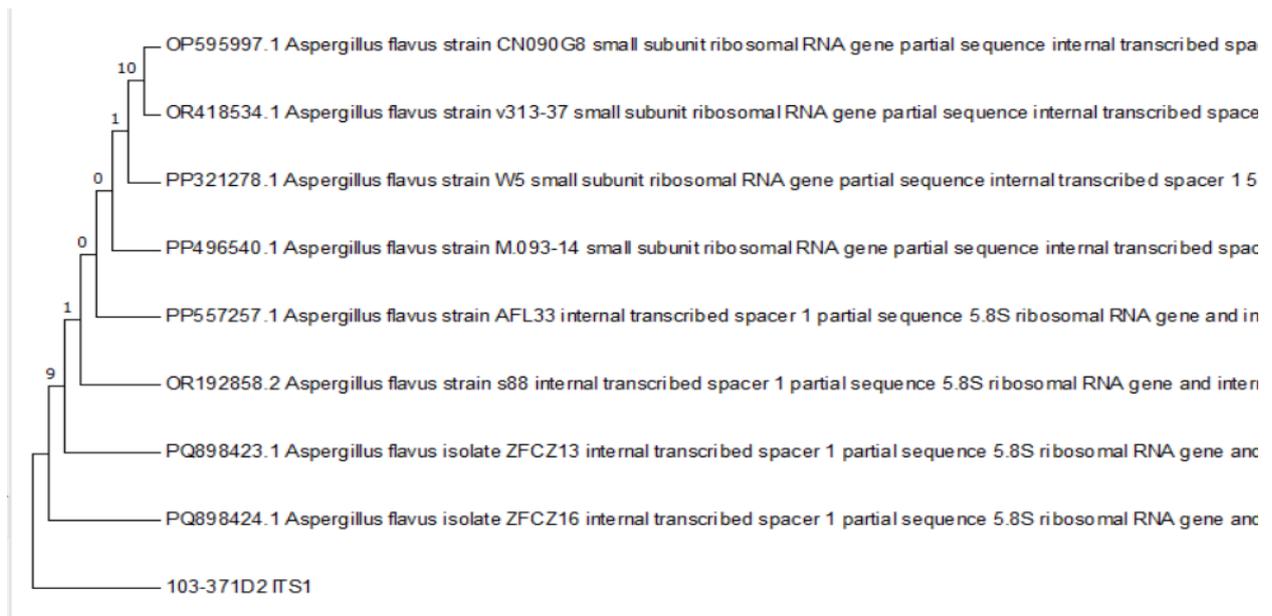
شکل ۳. عکس سمت راست تصویر میکروسکوپی کلاوسپوریوم، عکس سمت چپ تصویر پلیت کلاوسپوریوم

جدول ۴. نتایج نانودراپ

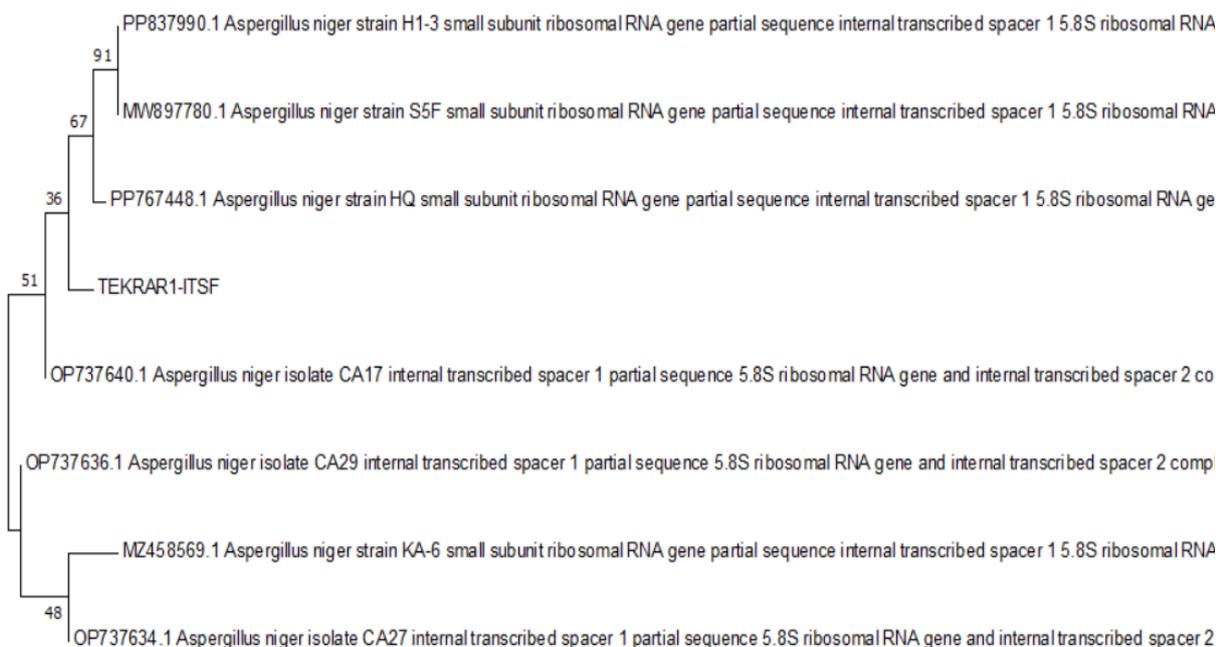
Location	Name	260 Raw	260	280	230	260/280	260/230	ng/ μ L
B1	A.niger/D1	0.354	0.305	0.155	0.137	1.966	2.223	305.3
B2	A.flavus/D2	0.343	0.288	0.153	0.167	1.885	1.728	288.15
B3	Penicillium/D4	0.275	0.222	0.13	0.128	1.703	1.74	221.85
B4	Cladosporium/D1	0.15	0.097	0.053	0.055	1.822	1.76	97



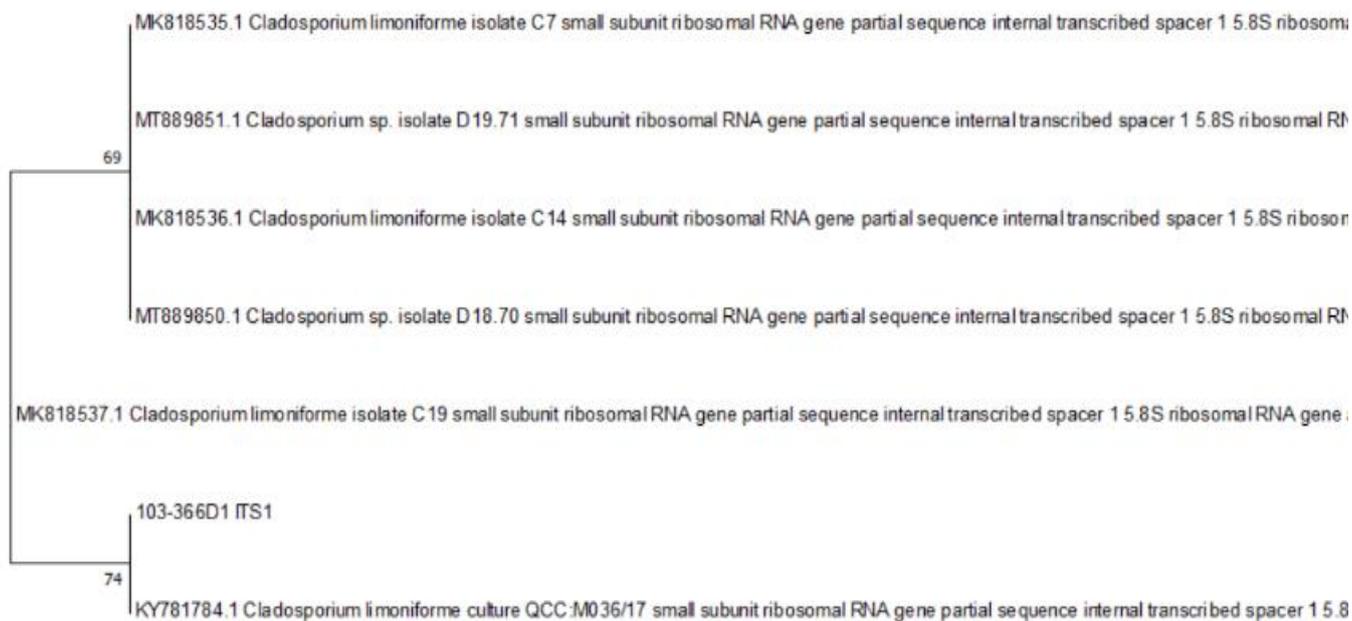
شکل ۴. درخت فیلوژنی *Penicillium chrysogenum*



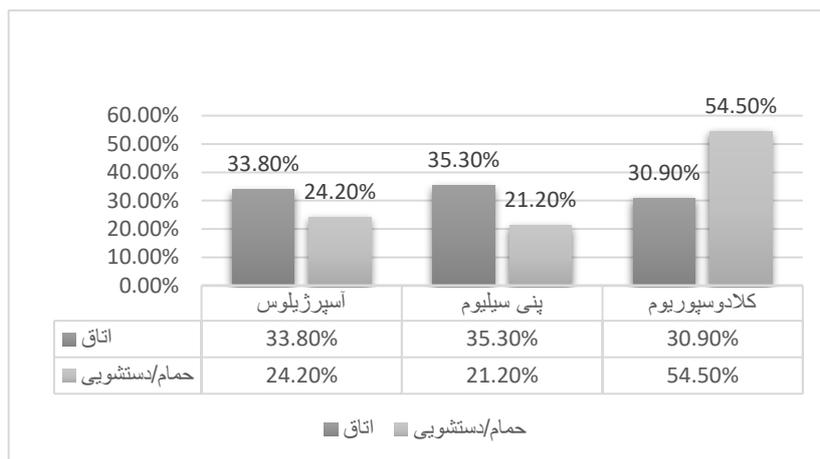
شکل ۵. درخت فیلوژنی *Aspergillus flavus*



شکل ۶. درخت فیلوژنی *Aspergillus niger*



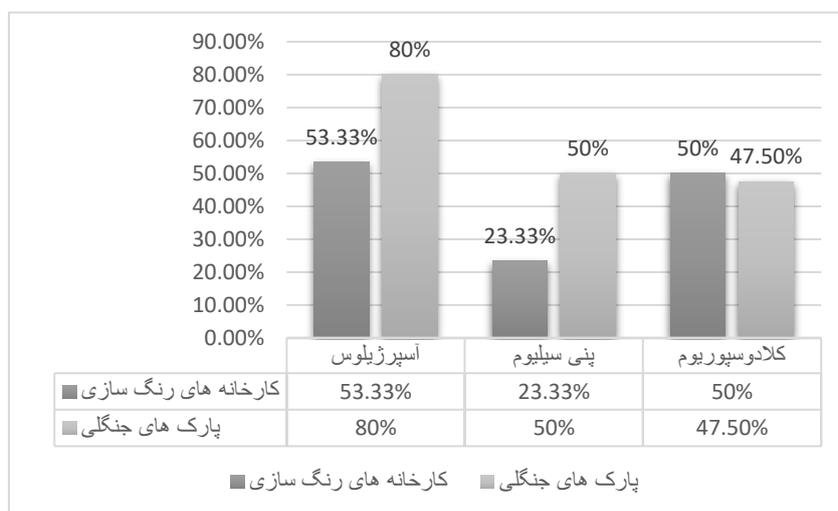
شکل ۷. درخت فیلوژنی *Cladosporium limoniforme*



شکل ۸. میزان قارچ های جدا شده از اتاق و حمام/دستشویی

جدول ۵. درصد قارچ های جدا شده از اتاق و حمام/ دستشویی به تفکیک

نمونه ی قارچ / مکان (هوا)	تعداد کل	درصد کل قارچ ها	اتاق	حمام/دستشویی
آسپرژیلوس	۳۱	۳۰.۷٪	۳۳.۸٪	۲۴.۲٪
پنی سیلیوم	۳۱	۳۰.۷٪	۳۵.۳٪	۲۱.۲٪
کلادوسپوریوم	۳۹	۳۸.۶٪	۳۰.۹٪	۵۴.۵٪



شکل ۹. میزان فراوانی قارچ ها در پارک های جنگلی و کارخانه های رنگ سازی

جدول ۶. درصد قارچ های جدا شده از پارک های جنگلی و کارخانه های رنگ سازی به تفکیک

نمونه ی قارچ / مکان (خاک)	تعداد کل	درصد کل قارچ ها	کارخانه های رنگ سازی	پارک های جنگلی
آسپرژیلوس	۳۳	٪ ۶۶	٪ ۵۳.۳۳	٪ ۸۰
پنی سیلیوم	۱۷	٪ ۳۴	٪ ۲۳.۳۳	٪ ۵۰
کلادوسپوریوم	۳۵	٪ ۷۰	٪ ۵۰	٪ ۴۷.۵

بحث

سیستم تولید مثل مادیان انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که از ۴۵۳ ناحیه ی نمونه برداری شده تولید مثل مادیان ۲۱۹ ناحیه (۴۸/۳٪) عوامل قارچی جداسازی شده است. عمده ی قارچ های جدا شده غالباً شامل: آسپرژیلوس (۵۴/۳۵٪)، اسکوپولاریوپسیس (۱۳/۹۶٪)، کلادوسپوریوم (۵/۲۵٪)، پنی سیلیوم (۴/۶۵٪)، آلترناریا (۳/۹۰٪) و فوزاریوم (۳/۰۳٪) بودند. بیشتر کلنی ها مربوط به آسپرژیلوس با ۳۶۲ کلنی که در بین آنها آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۱۵۶ کلنی جداسازی شد. پس از آسپرژیلوس، اسکوپولاریوپسیس با ۹۳، کلادوسپوریوم با ۳۵ و پنی سیلیوم با ۳۱ کلنی قرار داشتند (۶۰٪). در سال ۲۰۱۸ Ziaee و همکاران به شناسایی قارچ های ساپروفیت و آلرژیک زا در محیط هایی مانند مساجد، پارک ها و سرویس های بهداشتی عمومی، فروشگاه مواد غذایی، آزمایشگاه ها و بیمارستان ها پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه شناسایی قارچ های غالب در محیط های ذکر شده اعم از گونه های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و کلادوسپوریوم به ترتیب ۱۶/۴۲٪، ۱۶/۱۷٪، ۱۴/۹۲٪ بود (۳۱٪). در سال ۲۰۱۹ Tischner و همکاران طی یک مطالعه ی علمی به بررسی ویژگی های محیطی و طبقه بندی قارچ های میکروسکوپی جدا شده از رسوب موجود در لباسشویی حاوی الیاف نساجی بقایای مواد شوینده و رسوبات آهکی پرداختند. نتایج حاصل حاکی از آلودگی قارچی با میزان شدید در ۳۲٪ از لباسشویی ها بود که از این مقدار ۴۶٪ آنها توسط گونه های بیماری زا آلوده بودند و در مجموع ۳۲ گونه مخمر و ۳۹ گونه قارچ های رشته ای اعم از ۲۲٪ گونه های پنی سیلیوم، ۲۰/۰۳٪ گونه های کلادوسپوریوم و ۶/۸٪ گونه های آسپرژیلوس در محیط های

در سال ۱۴۰۱ لاری پور و همکاران، نمونه برداری و غربالگری قارچ های هالوفیل اختیاری از پارک های جنگلی جهت تولید آنزیم صنعتی پرداختند. بیشترین قارچ های جدا شده آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، کلادوسپوریوم، آلترناریا، موکور و ریزوپوس بودند (۹). در سال ۱۴۰۰ لاری پور و همکاران در یک پژوهش بیش از ۳۵۰ نمونه ی قارچ از خاک و هوای پارک های جنگلی تهران، به منظور تولید آنزیم های پکتیناز، سلولاز و لیپاز، جداسازی و شناسایی کردند. از میان این جدایه های شناسایی شده، ۲۷٪ آنها متعلق به جنس آسپرژیلوس، ۱۳٪ آنها متعلق به جنس پنی سیلیوم و ۱۵٪ آنها متعلق به جنس کلادوسپوریوم بودند (۵۸). در سال ۲۰۱۸ A. Alsohaili و M. Bani-Hasan مطالعه ای با هدف جداسازی و شناسایی قارچ های رشته ای از منابع محیطی مختلف در شمال شرقی صحرای اردن انجام دادند و گونه های قارچی از خاک و قسمت های گیاهی (برگ و میوه) جداسازی انجام گردید. در کل هشت گونه قارچی شناسایی شد که نتایج نشان داد آسپرژیلوس نایج شایع ترین و فراوان ترین قارچ از تمام مکان ها و منابع بود (۱۱). در سال ۲۰۱۹ Lavaee و همکاران مطالعه ای برای بررسی قارچ ها و جلبک های جدا شده از نمونه های شیرگاوهای مبتلا به ورم پستان از گاو داری های اطراف مشهد انجام دادند. عوامل بررسی شده ی آلودگی ۳۲ مورد از ۵۰۳ مورد (۸/۵٪) قارچ های رشته ای بودند. نتایج آنها نشان داد که گونه های پنی سیلیوم ۲/۸٪، گونه های آسپرژیلوس ۲/۶٪ و گونه های کلادوسپوریوم ۱/۲٪ بودند (۵۹). در سال ۱۳۹۵ آذروندی و همکاران مطالعه ای جهت جداسازی و شناسایی فلور قارچی اندام های خارجی

۴۸۳ جدایه ی خارجی شامل ۳۰ جنس جداسازی شدند که از میان آنها گونه های آسپرژیلوس ۲۲/۹۹٪، گونه های پنی سیلیوم ۸/۹٪ و گونه های کلادوسپوریوم ۵/۶٪ از نمونه ها را تشکیل می دادند(۱).

آنجایی که قارچ های ذکر شده در صنعت ، زیست پالایی، ایجاد بیماری و آلرژی در انسان و حیوان به صورت مشترک نقش مهمی را ایفا میکنند، مطالعه و شناسایی این ساپروفیت ها از اهمیت بالایی برخوردار است.

کشت بدست آمد(۶۱). در سال ۲۰۱۷ Nosratabadi و همکاران در یک پژوهش به جداسازی و شناسایی ساپروفیت های بیماری زا و غیر بیماری زا از ۶۰ نمونه خاک جزایر تنب بزرگ، ابوموسی و جزیره ی سیری پرداختند که در مجموع

نتیجه گیری

با توجه به مطالعه ی حاضر و مطالعات پیشین قارچ رشته ای اعم از گونه های آسپرژیلوس، گونه های پنی سیلیوم و گونه های کلادوسپوریوم جمعیت کثیری از نمونه های خاک ، هوا و محیط زندگی اطراف ما را به خود اختصاص میدهند و از

منابع

- Nosratabadi M, Kordbacheh P, Kachuei R, Safara M, Rezaie S, Afshari MA, Jafari H. Isolation and identification of non-pathogenic and pathogenic fungi from the soil of Greater Tunb, Abu-Musa and Sirri Islands, Persian Gulf, Iran. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2017 Nov 1;4(4):713-8.
- Raja, M., Praveena, G., William, S.J., Isolation, and identification of fungi from soil in Loyola College Campus, Chennai, In-dia. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2017, Vol. 6(2), pp. 1789-1795.
- Rashid, M.I., Mujawar, L.H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Is-mail, I.M., Ovens, M., Bacteria, and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol Res*, 2016, Vol. 183, pp. 26-41.
- Arshad M, Gul MT, Ullah A, Khan A, Islam S, Khan K, Rahim Z. Isolation and identification of Soil Fungi from Selected Regions of Peshawar and Charsadda, Pakistan. *The Sciencetech*. 2023;4(4).
- Gadde SS, Kalli VD. Applications of artificial intelligence in medical devices and healthcare. *International Journal of Computer Science Trends and Technology*. 2020;8(2):182-8.
- Stefanis C, Alexopoulos A, Voidarou C, Vavias S, Bezirtzoglou E. Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia microbiologica*. 2013 Jan;58(1):61-8.
- Magnuson JK, Lasure LL. Fungal diversity in soils as assessed by direct culture and molecular techniques. In 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City 2002 May (pp. 19-23).
- Gaddeyya G, Niharika PS, Bharathi P, Kumar PR. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. *Advances in Applied Science Research*. 2012 Nov 7;3(4):2020-6.
- Larypoor M, Movahedi M. Isolation and screening of facultative halophilic fungi producing industrial enzymes from Tehran Forest parks. *Knowledge of Microbiology*. 2023 Aug;2(1):68.
- Mishra RK, Verma DK, Pandey BK, Pathak N, Zeeshan M. Direct Colony Nested-PCR for the Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp.
- Alsohaili SA, Bani-Hasan BM. Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the Northern Eastern desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2018 Sep 1;11(3).
- Gaddeyya G, Niharika PS, Bharathi P, Kumar PR. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. *Advances in Applied Science Research*. 2012 Nov 7;3(4):2020-6.

13. Mulani RM, Turkmane KL. Diversity of hizospheric fungi of *Ceropegia bulbosa* Var. *bulbosa* Roxb. *J Global Biosci.* 2014;3(4):1089-93.
14. Pauzi AN, Muhammad N, Sairi NH, Putra TT, Gul MT, Rahim NF, Marzuki NA, Bakar MA, Talip BA, Abdullah N. The effect of different solvent extraction towards antiurolithiatic properties of *Euphorbia hirta* and *Orthosiphon stamineus*. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2019 Jul 1 (Vol. 269, No. 1, p. 012040). IOP publishing.
15. Lowenfels J, Lewis W. Teaming with microbes: The organic gardener's guide to the soil food web. Hachette+ ORM; 2014 Feb 4.
16. Gadde SS, Kalli VD. The resemblance of library and information science with medical science. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology.* 2021;11(9):323-7.
17. Jan HU, Saeed A, Parveen G, Mukhtar N, Siraj M, Sami A, Gul MT. Pharmacognostic Study of *Ehretia acuminata* R. Br. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences.* 2023 Jun 24;60(2):267-72.
18. Dar GH. Soil microbiology and biochemistry. New India Publishing; 2009.
19. Zareef H, Gul MT, Qureshi R, Aati H, Munazir M. Application of ethnobotanical indices to document the use of plants in traditional medicines in Rawalpindi district, Punjab-Pakistan. *Ethnobotany Research and Applications.* 2023 Apr 12;25:1-29.
20. Currah R, Smreciu EA, Hambleton S. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany.* 1990 Jun 1;68(6):1171-81.
21. Wipf D, Krajinski F, van Tuinen D, Recorbet G, Courty PE. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist.* 2019 Aug;223(3):1127-42.
22. Gul MT, Dheyab AS, Shaker EK, Muhammad N, Pauzi AN. In vitro evaluation of anti-urolithiatic properties of *Strobilanthes crispus* extracted using different solvents. *Research Journal of Chemistry and Environment.* 2020 Jan;24(1):117-21.
23. Baumgardner DJ. Soil-related bacterial and fungal infections. *The Journal of the American Board of Family Medicine.* 2012 Sep 1;25(5):734-44.
24. Prabakaran M, Merinal S, Panneerselvam A. Investigation of phylloplanemycoflora from some medicinal plants. *Eur J Exper Biol.* 2011;1(2):219-5.
25. Udoh IP, Eleazar CI, Ogeneh BO, Ohanu ME. Studies on fungi responsible for the spoilage/deterioration of some edible fruits and vegetables. *Advances in microbiology.* 2015 Apr 1;5(04):285.
26. Badiie P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian Journal of Medical Research.* 2014 Feb 1;139(2):195-204.
27. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases.* 2011 Feb 1;11(2):142-51.
28. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection.* 2004 Mar;10:48-66.
29. Aghamirian MR, Ghiasian SA. The prevalence of fungi in soil of Qazvin, Iran.
30. Davet P, Rouxel F. Detection and isolation of soil fungi. 2000.
31. Ziaee A, Zia M, Goli M. Identification of saprophytic and allergenic fungi in indoor and outdoor environments. *Environmental monitoring and assessment.* 2018 Oct;190(10):574.
32. Chadeganipour M, Shadzi SH, Nilipour SH, AHMADI GR. Airborne fungi in Isfahan and evaluation of allergenic

- responses of their extracts in animal model.
33. Picco AM, Rodolfi M. Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2000 Jan 1;45(1-2):43-7.
 34. Kuhn RC, Trimble MW, Hofer V, Lee M, Nassof RS. Prevalence and airborne spore levels of *Stachybotrys* spp. in 200 houses with water incursions in Houston, Texas. *Canadian journal of microbiology*. 2005 Jan 1;51(1):25-8.
 35. Basilico MD, Chiericatti C, Aringoli EE, Althaus RL, Basilico JC. Influence of environmental factors on airborne fungi in houses of Santa Fe City, Argentina. *Science of the Total Environment*. 2007 Apr 15;376(1-3):143-50.
 36. Kim KY, Kim HT, Kim D, Nakajima J, Higuchi T. Distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in the feedstuff-manufacturing factories. *Journal of hazardous materials*. 2009 Sep 30;169(1-3):1054-60.
 37. Sousa AC, Almeida JR, Pereira CC, Ramiro Pastorinho M, Pereira ÂM, Nogueira AJ, Taborda-Barata L, Teixeira JP, Correia AC, Alves A. Characterization of fungal communities in house dust samples collected from central Portugal—a preliminary survey. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2014 Aug 18;77(14-16):972-82.
 38. Fukutomi Y, Taniguchi M. Sensitization to fungal allergens: resolved and unresolved issues. *Allergology International*. 2015;64(4):321-31.
 39. Foladi S, Hedayati MT, Shokohi T, Mayahi S. Study on fungi in archives of offices, with a particular focus on *Stachybotrys chartarum*. *Journal de mycologie médicale*. 2013 Dec 1;23(4):242-6.
 40. Rafiei A, Amirrajab N. Fungal contamination of indoor public swimming pools, Ahwaz, South-west of Iran. *Iranian journal of public health*. 2010 Sep 30;39(3):124.
 41. Horner WE, Worthan AG, Morey PR. Air-and dustborne mycoflora in houses free of water damage and fungal growth. *Applied and environmental Microbiology*. 2004 Nov;70(11):6394-400.
 42. Chandini K, Rajeshwari N. Isolation and identification of soil fungi in Mattavara forest, Chikamagalur, Karnataka. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017;6(5):721-6.
 43. Tarasco E, De Bievre C, Papierok B, Polisenio M, Triggiani O. Occurrence of entomopathogenic fungi in soils in Southern Italy. *Entomologica*. 1997;31:157-66.
 44. Gomathi S, Ambikapathy V, Panneerselvam A. Studies on soil mycoflora in chilli field of Thiruvavur District. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*. 2011;1(4):117-22.
 45. Ewekeye T, Oke O, Li-Hammed M. Soil mycoflora studies of some locations in Lagos State, Nigeria. *Report and Opinion*. 2012;4(4):52-7.
 46. Yazdanparast SA, Dargahi H, Shahrokhi S, Farahani RH. Isolation and investigation of keratinophilic fungi in the parks of municipality districts of Tehran. *Thrita J Med Sci*. 2013 Sep 6;2(1):2-5.
 47. Zarrin M, Haghgoo R. Survey of keratinophilic fungi from soils in Ahvaz, Iran.
 48. Kachuei R, Emami M, Naeimi B, Diba K. Isolation of keratinophilic fungi from soil in Isfahan province, Iran. *Journal de mycologie medicale*. 2012 Mar 1;22(1):8-13.
 49. Hedayati MT, Mohseni-Bandpi A, Moradi S. A survey on the pathogenic fungi in soil samples of potted plants from Sari hospitals, Iran. *Journal of Hospital Infection*. 2004 Sep 1;58(1):59-62.
 50. Parhama S, Ghahrib M, Ghasemiana A, Barahimia A. Isolation of dematiaceous fungi from soil of Mashhad, Neyshabur (North-east of Iran) and Isfahan (center of Iran) cities. *Sci J Pure Appl Sci*. 2014;3(5):309-12.
 51. Mishra BK, Dadhich SK. Production of amylase and xylanase enzymes from soil fungi of Rajasthan. *J. Adv. Dev. Res*. 2010;1(1):21-3.

52. Gostinčar C, Lenassi M, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A. Fungal adaptation to extremely high salt concentrations. In *Advances in applied microbiology* 2011 Jan 1 (Vol. 77, pp. 71-96). Academic Press.
53. Gul MT, Muhammad N, Pauzi AN, Bakar MF, Talip BA, Abdullah N, Rahim NF, Syukriah WN, Marzuki W, Din LB, Ibrahim N. Evaluation of *Phyllanthus niruri* L. from Malaysia for In-vitro Anti-Urolithiatic Properties by Different Solvent Extraction: Properties of Anti-Urolithiatic. *Biological Sciences-PJSIR*. 2021 Mar 3;64(1):81-6.
54. Akhtar S, Mahmood-ul-Hassan M, Ahmad R, Suthor V, Yasin M. Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil Environ*. 2013 Jun 1;32(1):55-62.
55. Maheswari NU, Komalavalli RJ. Diversity of soil fungi from Thiruvavur district, Tamil Nadu, India. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2013;2:135-41.
56. Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*. 2011 Mar;98(3):426-38.
57. Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of clinical microbiology*. 1991 Feb;29(2):393-4.
58. Javanshir R, Azin M, Larypoor M. Optimization of *Penicillium halotolerans* cellulase and lipase and pectinase production using Taguchi method on *New Cell Mol Biotech j*. 12/47, 2022
59. Lavaee M, Eidi S, Khoramian B. High prevalence of *Prototheca* spp. and isolation of fungal species in milk samples from cows suffering from mastitis in Mashhad city, northeast Iran. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. 2019 Feb 1;11(2):21-6.
60. Azarvandi A, Talebkhargarosi M, Khosravi A, Hosseini A, Gharagozlou F. Isolation and identification of fungal flora from external organs of the reproductive system of mares on *Journal of Veterinary Research*. 72,1:103-110, 2017.
61. Tischner Z, Kredics L, Marik T, Vörös K, Kriszt B, Péter B, Magyar D. Environmental characteristics and taxonomy of microscopic fungi isolated from washing machines. *Fungal Biology*. 2019 Sep 1;123(9):650-9.

مهندسی آنزیم اوریکاز جهت بهبود خصوصیات کینتیکی آن

عاطفه طزری^{۱*}، زهرا کیانمهر^۲

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۲. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

مقدمه: آنزیم ها به عنوان دارو با داشتن تمایل و ویژگی بالا و توانایی تبدیل تعداد زیادی مولکول هدف به محصول، از سایر انواع داروها متمایز می شوند. یکی از مشکلات پیش روی داروهای آنزیمی پایداری پایین آنهاست که برای مقابله با آن راهکارهای مختلفی ارائه شده است. آنزیم اوریکاز باعث تبدیل اسید اوریک با حلالیت کم به آلانتوئین با حلالیت بیشتری می شود تا به راحتی از بدن دفع شود. به این ترتیب اوریکاز می تواند به عنوان یک آنزیم دارویی که در کاهش اسید اوریک خون نقش دارد به شمار آید. هدف از این مطالعه دستیابی به آنزیم اوریکاز مهندسی شده با خصوصیات کینتیکی مناسب است.

مواد و روش ها: پس از تکثیر ژن طبیعی و جهش یافته سنتز شده با واکنش PCR، هضم برش آنزیمی محصولات PCR و پلاسمید تخلیص شده جهت انجام لیگاسیون صورت گرفت. وکتور بیانی pET42a(+) حاوی ژن های طبیعی و جهش یافته اوریکاز/آسپرژیلوس فلاووس به باکتری/شرشیاکلی سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد و برای تایید ترانسفورماسیون کلنی PCR گذاشته شد. پس از تایید بیان پروتئین های نوترکیب با روش SDS-PAGE با استفاده از رزین تمایلی پروتئین های نوترکیب تخلیص شدند. در نهایت خصوصیات کینتیکی محصول تخلیص شده، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها و نتیجه گیری: اندازه محصول PCR ژن های طبیعی و جهش یافته به ترتیب ۹۱۵ و ۱۲۱۵ جفت باز و همچنین وزن مولکولی پروتئین های تخلیص شده طبیعی ۳۵ کیلو دالتون و جهش یافته حدوداً ۴۰ کیلو دالتون تعیین شدند. خصوصیات کینتیکی آنزیم طبیعی و مهندسی شده شامل ثابت میکائیلیس منتن K_m و سرعت ماکزیم V_{max} برای ژن های طبیعی و جهش یافته به ترتیب و (۲/۴۸ میلی مولار و ۳/۳۷۶ میکرومول در دقیقه) و (۰/۳۹ میلی مولار و ۱/۳۳ میکرومول در دقیقه) اندازه گیری شدند. آنزیم جهش یافته در مقایسه با آنزیم طبیعی از خصوصیات کینتیکی بهتری برخوردار بود.

کلمات کلیدی: اوریکاز ، مهندسی پروتئین ، کینتیک ، خالص سازی

Uricase engineering for improving its kinetic properties

Atefeh tazari ^{*1}, Zahra kianmehr²

1. Phd student, Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biochemistry, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Enzymes as drugs with high affinity and specificity and the ability to convert a large number of target molecules to product are distinguished from the other types of drugs. One of the problems with drug enzymes is their low stability which different ways to deal with them have been used. The uricase enzyme converts uric acid with low solubility to allantoin, which is more soluble and easily disposed of the body. Thus, the uricase can be considered as a drug enzyme which plays a role in reducing uric acid in blood. The aim of this study was to achieve the engineered uricase with suitable kinetic properties.

Methods: Initially, after PCR, enzymatic digestion was performed on genes and purified plasmid to perform ligation. The pET 42a (+) expression vectors contain native and mutated genes of *Aspergillus flavus* uricase were transformed into *E. coli* strain BL21 and colony PCR was done for transformation confirmation. The expression of recombinant proteins was analyzed by SDS-PAGE technique and purified using affinity column. Finally, their kinetic properties were investigated.

Results & Conclusion: As a result of PCR, the length of native and mutated genes was 915 and 1215 bp, respectively. The molecular weight of the native purified protein was 35 kDa and the mutated was approximately 40.0 kDa. Then, the kinetic properties of the native and engineered enzymes including the Michaelis constant K_m and V_{max} were 2/48 mM and 3/376 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and 0/39 mM and 1/33 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively.

The mutated enzyme had better kinetics than the native enzyme, but further studies and experiments should be done.

Keywords: Uricase, Protein engineering, Kinetics, Purification.

مقدمه

می‌شود که با اکسیدشدن توسط آنزیم گزانتین‌اکسیداز به اسیداوریک تبدیل می‌شود (۲).

آنزیم اوریکاز (EC 1.7.3.3) آنزیمی است که در بسیاری از گونه های جانوری از میکروارگانیسم ها تا پستانداران حفظ شده‌است. محصول نهایی متابولیسم پورین‌ها در این موجودات، آلانتوئین، اوره و آمونیاک می‌باشد. آلانتوئین ۵ تا ۱۰ برابر محلول تر از اسیداوریک می‌باشد. باوجود این در پرایمات‌های هومینوئید مثل شامپانزه، گوریل ها و اورانگوتان‌ها و نیز در انسان به دلیل جهش های تکاملی، آنزیم فاقد فعالیت بوده و محصول متابولیسم پورین‌ها اسیداوریک است. این امر موجب افزایش غلظت اسید اوریک در خون شده و خطر ابتلا به بیماری هایپر اوریسمی (افزایش شدید اسید اوریک خون) در انسان را بالا می‌برد (۳).

آنزیم اورات اکسیداز نو ترکیب به نام راسبوریکاز (Rasburicase)، مشهور است که از ۳۰۲ اسید آمینه تشکیل شده و جرم ملکولی ۳۴/۵ دالتون دارد که دارای ساختار تترامر (دو عدد دایمر روبروی هم) می‌باشد. این آنزیم از *آسپرژیلوس فلاووس* تهیه شده و در سال ۲۰۰۱ در آژانس داروی اروپا (EMA)، خاور میانه و آفریقا (EMEA) با نام تجاری (Fasturtec®) و در سال ۲۰۰۲ در سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) با نام تجاری

نقرس بیماری است که در آن سطح اسیداوریک خون افزایش می‌یابد و موجب بروز التهاب مفاصل و کلیه می‌شود. اسیداوریک در آب محلول است و به طور طبیعی توسط کلیه به میزان ۶۰۰ تا ۷۰۰ میلی‌گرم در روز از بدن خارج می‌شود. هرگاه میزان اسیداوریک در مردان از ۷ گرم بر دسی میلی لیتر و در زنان از ۶ گرم بر دسی‌لیتر بیشتر شود هیپراوریسمی رخ می‌دهد (۱). اسید اوریک به‌طور طبیعی محصول کاتابولیسم نوکلئوتیدهای پورین می‌باشد. ابتدا آدنوزین توسط آنزیم دآمیناز به اینوزین تبدیل می‌شود که این محصول نیز به نوبه‌ی خود به هیپوگزانتین تبدیل می‌شود. هیپوگزانتین توسط آنزیم هیپوگزانتین اکسیداز به گزانتین تبدیل

نویسنده ی مسئول: دانشجوی دکتری، گروه

میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

آدرس الکترونیک: at.tazari@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۹/۱۳

لیز توموری (TLS) در آمریکا و اروپا تاییدیه مصرف دریافت نکرده است (۶). در این راستا، باهدف بهبود خصوصیات درمانی، طرح مهندسی آنزیمی اورات اکسیداز با استفاده از تکنیک (PASylation) ارائه می گردد.

یکی از مهمترین چالش های داروهایی که نیمه عمر پلاسمای کوتاه دارند، تزریق روزانه با دوز بالا است که می تواند منجر به بار اقتصادی، ناراحتی بیمار و عوارض جانبی نامطلوب شود. (PASylation) تکنیکی جهت بهبود و افزایش نیمه عمر پلاسمایی پروتئین های فعال دارویی است که بر خلاف پگیلاسیون با کاهش بازده، تغییر ساختار فضایی و فعالیت عملکردی پروتئین هدف همراه نیست. توالی های (PASylation) پلیمرهای زیستی هیدروفیل و بدون بار و از لحاظ خصوصیات بیوفیزیکی بسیار مشابه پلیمر پلی اتیلن گلیکول بوده که در سطح ژنتیکی به پروتئین درمانی متصل می شوند و سبب افزایش حجم هیدرودینامیکی آن می گردند. توالی (PAS) در پلاسمای خون با ثبات است، این توالی ها زیست تخریب پذیر بوده (توسط آنزیم های کلیوی) و فاقد سمیت و ایمونوژنسیته هستند (۷). فن آوری (PASylation) بر مبنای همجوشی ژنتیکی بیوفرم داروها با توالی پرولین (Pro)، آلانین (Ala) و آمینو اسید سرین (Ser) است (۸). این توالی های بدون بار، تنها در کنار و حاشیه محل فعالیت بیولوژیکی داروها می باشند و در حیوانات ایجاد ایمونوژنسیته نمی کند. دنباله

(Elitek®) جهت مصرف برای درمان سندروم لیز تومور (TLS) پس از شیمی درمانی مورد پذیرش قرار گرفته است. این ترکیب به طور مشخصی سطح اسید اوریک موجود در سرم را بسیار سریعتر از آلپورینول کاهش می دهد و نسبت به اورات اکسیداز غیر نو ترکیب بسیار بهتر توسط بیمار تحمل می شود. نیمه عمر آن نیز ۱۸-۲۱ ساعت است و به صورت روزانه و تزریق درون رگی به مدت یک هفته پس از شیمی درمانی تجویز می شود. قیمت این دارو بسیار بالا بوده و هزینه های درمانی سنگینی را برای بیمار در پی خواهد داشت (۴). اورات اکسیداز در ۵ درصد از بیماران پاسخ های ایمونولوژیک، ازدیاد حساسیت و شوک آنافیلاکسی را در پی دارد. حدود ۱۴ درصد از بیماران علیه اورات اکسیداز آنتی بادی می سازند و در طی دوره ی درمان و دوز های تکرار شونده این دارو، آنتی بادی های خنثی کننده نیز ساخته می شوند که کارایی اورات اکسیداز رابه شدت کاهش می دهند. علاوه بر این نیمه عمر کوتاه آنزیم در خون یکی از مشکلات مصرفی آن می باشد که تجویز روزانه آن را در پی دارد (۵). به منظور کاهش ایمونوژنسیته و افزایش نیمه عمر اورات اکسیداز تلاش هایی صورت گرفته است که از آن جمله پگیلاسیون آنزیم است. فرم پگیله شده اورات اکسیداز با منبع خوکی نیز با نام داروی (Pegloticase) از سال ۲۰۱۱ تاییده ی مصرف توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) را برای درمان بیماری نقرس (gout) را دریافت کرده است اما برای درمان سندرم

به انتهای کربوکسیل (C-terminal) پروتئین است. ویژگی‌های توالی‌های پاسیله شده با ابزارهای بیوانفورماتیکی شامل همولوژی مدلینگ، ترسیم نقشه رامچاندران و شبیه‌سازی مولکولار داینامیک بررسی شد. توالی ژن‌های طبیعی و جهش یافته توسط شرکت (BioMatik) (کانادا) سنتز شد.

پرایمر	توالی
UOX.Native F	CATATGTCCGCAGTAAAAGCAGCCCG
UOX.Native R	CTCGAGCAATTTAGACTTCAGAGAGGACCGGCC
UOX.Mutant F	CATATGTCCGCAGTAAAAGCAGCCCGCTAC
UOX.Mutant R	CTCGAGGGCGGGGGCGGAGG

طراحی پرایمر و واکنش (PCR)

پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های طبیعی و جهش یافته با نرم‌افزار (Gene Runner) طراحی شدند. طول پرایمرها بین ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید و دمای ذوب (Tm) بین ۵۴ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. محصولات (PCR) روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شدند (۱۰).

جدول ۱. مشخصات پرایمر ژن طبیعی و جهش یافته.

تخلیص (DNA) از روی ژل

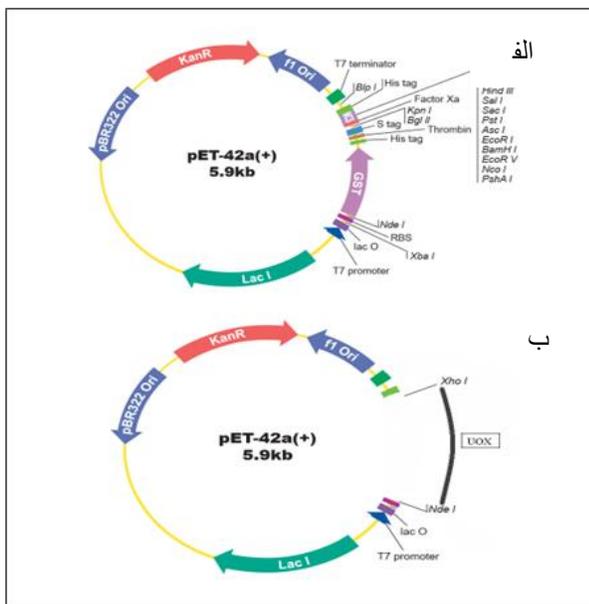
های ۲۰۰ الی ۶۰۰ تایی اسیدهای آمینه (PAS) منجر به افزایش نیمه عمر پلاسمایی دارو با ضریب ۱۰ الی ۱۰۰ می‌گردد. از کاربردهای موفقیت آمیز (PASylation) پروتئین‌ها می‌توان به اینترفرون، هورمون رشد و قطعات Fab آنتی‌بادی اشاره نمود. (Pasylation) به عنوان یک روش برگزیده برای افزایش خصوصیات کینتیکی دارویی مورد استفاده است. (Pasylation) داروهای زیستی در اشرشیا کلی به خوبی سیستم‌های بیان یوکاریوتی نظیر (HEK و CHO) مناسب هستند و شامل یک دنباله (PAS) همگن با طول دقیق و معین می‌شود (۹).

در مطالعه حاضر، با هدف بهبود خصوصیات کینتیکی و افزایش فعالیت آنزیم اوریکاز، ژن‌های طبیعی و جهش یافته اوریکاز با توالی‌های (PAS) ترکیب و به صورت فیوژن بیان شدند. بررسی ساختار، بیان، فعالیت و خصوصیات کینتیکی پروتئین‌های نو ترکیب به منظور ارائه یک آنزیم کارآمدتر برای کاربردهای صنعتی و بالینی انجام شد.

مواد و روش‌ها

طراحی ژن جهش یافته و سنتز ژن

برای بهبود خصوصیات کینتیکی آنزیم اوریکاز، ژن آن تحت مهندسی پروتئین قرار گرفت. روش استفاده شده پاسیله‌سازی (Pasylation) بود که شامل اضافه کردن تکرارهای تصادفی از آمینو اسیدهای پرولین، آلانین و سرین



شکل ۱. الف) نقشه ژنوم وکتور pET42a (ب) وکتور pET42a حاوی ژن برش یافته.

هضم آنزیمی و لیگاسیون

ژن‌ها و پلاسمید با آنزیم‌های برش‌دهنده (XhoI و NdeI) هضم شدند و پس از بررسی روی ژل آگارز، لیگاسیون با (T4 DNA Ligase) انجام گرفت. ترکیب لیگاسیون شامل ۵.۵ میکرولیتر Insert، ۲/۵ میکرولیتر وکتور، ۱ میکرولیتر لیگاز و ۱ میکرولیتر بافر (Tango) بود و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد.

آماده‌سازی سلول‌ها و ترانسفورماسیون

سلول‌های مستعد *شرشیا کلی* (BL21 (DE3) با کشت اولیه روی محیط (LB) آگار آماده شدند. سلول‌ها پس از رشد شبانه و رسیدن به OD 0/5–0/6، سرد و با بافر FB (100 KCl میلی‌مولار، 50 CaCl₂·2H₂O میلی‌مولار،

برای استخراج محصول PCR از ژل، از کیت Tian Gene استفاده شد. ژل برش داده شده در بافر PC حل شد و ۱۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محلول به ستون سانتریفیوژی منتقل و پس از شستشو با بافر PW، DNA بازیابی شد و روی ژل دوباره بررسی گردید.

تخلیص پلاسمید و آماده‌سازی وکتور

تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد. باکتری (*E. coli*) حاوی وکتور (pET42a) در محیط (LB) حاوی کانامایسین (۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) کشت داده شد. سلول‌ها سانتریفیوژ و رسوب جمع‌آوری شد، سپس با بافرهای لیز قلیایی شامل بافر ۱ (گلوکز ۵۰ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میکرولیتر)، بافر ۲ (NaOH ۰/۲ نرمال، SDS 1٪) و بافر ۳ (پتاسیم استات ۵ مولار، استیک اسید) لیز شدند. پس از سانتریفیوژ، فاز آبی حاوی (DNA) جمع‌آوری و با ایزوپروپانول رسوب داده شد، سپس با اتانول ۷۰٪ شسته شد و در بافر (TE) حاوی (RNase نگهداری گردید (۱۱). (شکل ۱)

اوریک به آلانتوئین و ثبت جذب نوری در طول موج ۵۵۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر تعیین شد.

فرمول محاسبه فعالیت آنزیم اوریکاز: (۱۲)

$$V = (\Delta A) \times 0.16 \text{ ml} \times \text{df}$$

$$39/2 \times 0.15 \times 0.106 \text{ ml}$$

سنجش پروتئین و (SDS-PAGE)

غلظت پروتئین با دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. (SDS-PAGE) شامل ژل جداکننده ۱۲٪ و ژل متراکم کننده ۵٪ بود. نمونه‌ها با بافر X4 به نسبت ۱:۴ مخلوط و ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. پس از الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی بلو و سپس رنگ‌زدایی با محلول رنگ‌بر انجام شد تا باندهای پروتئینی مشاهده گردید (۱۳).

تخلیص پروتئین

پروتئین‌های نو ترکیب با رزین (Nickel-IDA Agarose) (۶٪) طبق پروتکل (jena Bioscience) تخلیص شدند. عصاره پروتئین روی رزین لود شد، شستشو با (Washing Buffer) انجام گرفت و پروتئین (-His tagged) با (Elution Buffer) استخراج شد. خلوص پروتئین با مشاهده تک باند در (SDS-PAGE) تایید شد.

گلیسرول ۱۰٪، 10 MOPS میلی‌مولار، pH 6/5 آماده گردیدند. (DNA) لیگاته به سلول‌ها اضافه و با شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه منتقل شد. سلول‌ها یک ساعت در محیط (LB) بازیابی و سپس روی محیط (LB) آگار حاوی کانامایسین کشت داده شدند. صحت ترانسفورماسیون با کلنی (PCR) و پرایمرهای (universal) تایید شد. محصولات (PCR) روی ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید و مشاهده باند در موقعیت مورد نظر نشان‌دهنده موفقیت ترانسفورماسیون بود (۱۱).

بهینه‌سازی بیان پروتئین

نمونه‌های ترانسفورم شده در محیط (LB) مایع حاوی کانامایسین ۴۰ میلی‌مولار کشت داده شدند. برای بهینه‌سازی بیان پروتئین، غلظت IPTG (۱-۰/۱ میلی‌مولار)، دما (۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و زمان القا (۵، ۷ و ۱۶ ساعت) تغییر داده شد. پس از القا، سلول‌ها سانتریفیوژ و رسوب جمع‌آوری شد.

لیز سلولی و سنجش فعالیت آنزیم

رسوب سلولی با بافر لیز (0/344 Na₂HPO₄، NaCl، 0/876 EDTA 10 میکرولیتر، گلیسرول ۱٪، حجم کل ۵۰ میلی‌لیتر، pH 8) و سونیکاسیون روی یخ انجام شد. عصاره محلول برای آنالیز پروتئین و سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. فعالیت اوریکاز با اندازه‌گیری تبدیل اسید

بررسی پارامترهای کینتیکی

دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و pH ۸/۶ اندازه گیری شد و پارامترهای کینتیکی توسط ترسیم منحنی لین ویوربرگ در نرم افزار (UVprob2/0) محاسبه شدند.

جهت مطالعه کینتیک آنزیم پارامترهای کینتیکی شامل ثابت میکائیلیس منتن و سرعت ماکزیمم اندازه گیری شدند. فعالیت آنزیم در حضور غلظت های مختلف سوبسترا یعنی اسیداوریک (از ۰/۵ تا ۷ میلی مولار) با دو بار تکرار در

نتایج

پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین های

اوریکاز- (PAS)

ساختاری ایجاد شد و بهترین مدلها بر اساس انرژی (DOPE) انتخاب شدند. آنالیز ساختارهای پیش بینی شده نشان داد که بیش از ۸۵٪ اسیدهای آمینه در نواحی "Most Favoured" نمودار رامانچاندان قرار دارند و (RMSD) مدلها کمتر از ۱۳ / Å است، که بیانگر صحت و پایداری ساختارهای پیش بینی شده است. (جدول ۲)

جای گیری درست آمینواسیدها در ساختار پروتئین را تایید می کند. توالی انتخاب شده برای مدل پایدار، (uricase-

جهت بررسی ساختار سه بعدی فیوژن های اوریکاز با توالی های (PAS)، از روش همسان بنیان سازی (homology modeling) با استفاده از نرم افزار (MODELLER 9V11) بهره گرفته شد. ابتدا توالی پروتئینها با پایگاه داده (PDB) مقایسه شد و بهترین الگوهای ساختاری بر اساس میزان تشابه توالی و مقادیر (E-value) انتخاب گردیدند. سپس ۱۰۶۰۰۰ مدل نمودار رامانچاندان مدل منتخب نیز نشان داد که تمامی اسیدهای آمینه در نواحی مورد پسند قرار دارند، که PAS1-100) بود که شامل باندهای (PAS) مشخص و توالی کامل اوریکاز می باشد.

PDB/PSVS	Most favoured regions %	Additionally allowed regions %	Generously allowed regions %	Disallowed regions %	<i>Procheck (phi-psi)³</i>	<i>RMSD</i>	<i>H-bond</i>	<i>nonpolar-bond</i>	<i>affinity</i>
PAS1-75-uricase.B99993259	۹۲/۰۰	۶/۲۰	۰/۶۰	۱/۲۰	-۰/۴۷	۰/۱۲	5	4	-۶/۹
PAS1-100-uricase.B99998019	۸۸/۸۰	۱۰/۳۰	۰/۶۰	۰/۳۰	-۰/۷۹	۰/۱۲	5	3	-۷/۵
PAS1-300-uricase.B99998492	۸۵/۷۰	۱۱/۵۰	۰/۹۰	۱/۹۰	-۱/۳	۰/۱۳	5	2	-۶/۹
PAS1-500-uricase.B99992772	۸۷/۰۰	۹/۸۰	۱/۸۰	۱/۳۰	-۱/۸۹	۰/۱۱	3	8	-۸/۳

جدول ۲. خصوصیات شیمی فیزیک توالی طراحی شده

تکثیر ژن های اوریکاز

یافته به ترتیب ۹۱۵ و ۱۲۱۵ جفت باز بود (شکل ۲). نتایج نشان داد که محصولات (PCR) با اندازه مورد انتظار تولید شده‌اند، که صحت تکثیر ژن‌ها را تایید می‌کند.

ژن‌های طبیعی و جهش یافته اوریکاز با استفاده از واکنش (PCR) تکثیر شدند. محصولات (PCR) بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شدند و طول ژن‌های طبیعی و جهش

تخلیص پلاسمید

باند‌های مشخص و خالص مشاهده شد، که نشان‌دهنده موفقیت تخلیص و سلامت پلاسمید بود (شکل ۳).

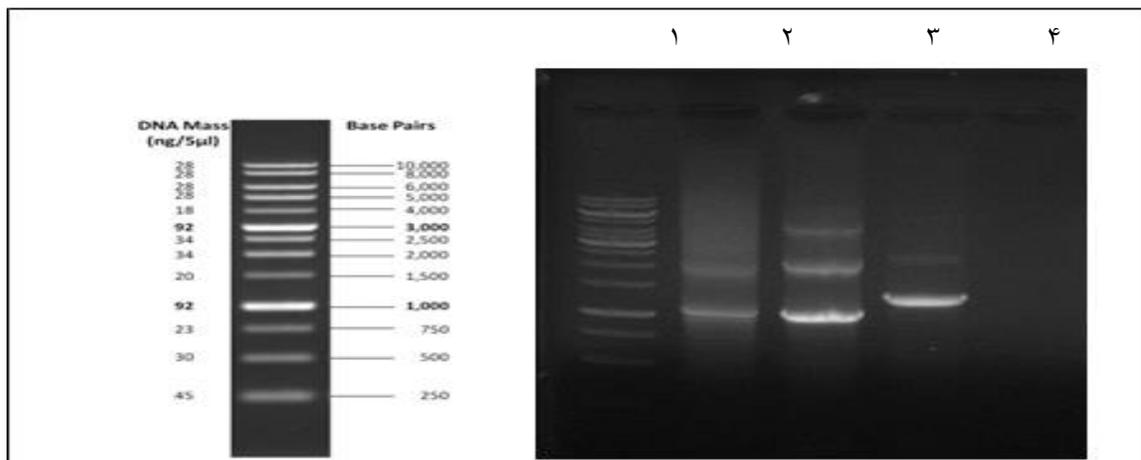
پلاسمیدهای حاوی ژن های اوریکاز از *اشرشیا کلی* حاوی ناقل با استفاده از روش لیز قلیایی تخلیص شدند. پس از تخلیص، پلاسمیدها بر روی ژل آگارز بررسی شدند و

هضم آنزیمی و لیگاسیون

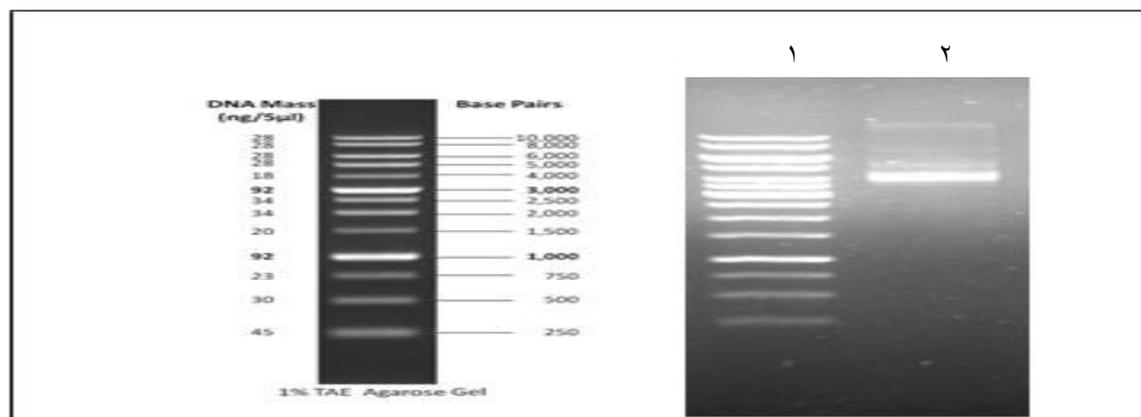
هضم آنزیمی بر روی ژل بررسی شد و باند‌های مربوطه مشاهده گردید (شکل ۴). سپس لیگاسیون ژن‌ها به

ژن‌ها و پلاسمید (pET42a) به صورت جداگانه با آنزیم‌های (Xho1 و Nde1) برش داده شدند. محصولات

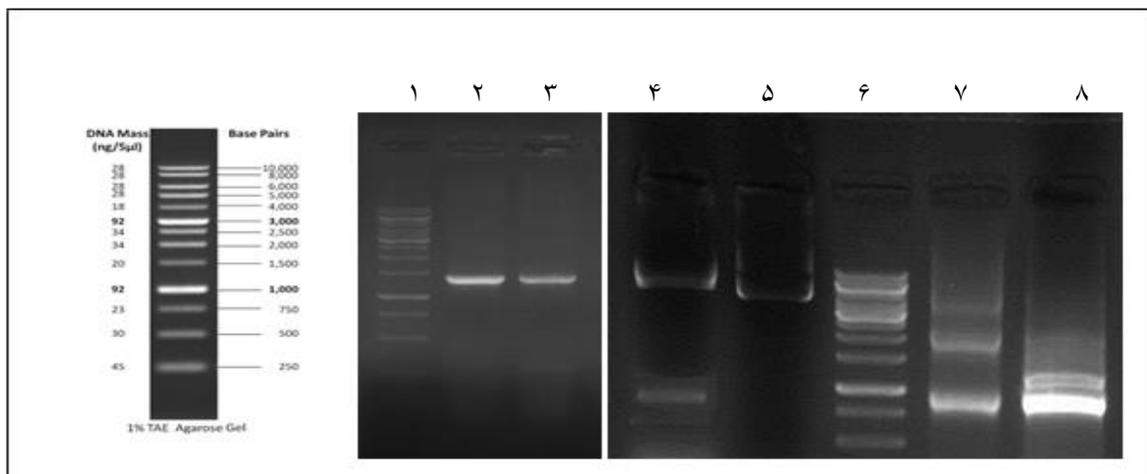
پلاسمید انجام شد و ترانسفورماسیون به میزبان BL21 (DE3) شرشیا کلی صورت گرفت.



شکل ۲. نمونه های (PCR) شده. ۱: مارکر. ۲: نمونه طبیعی. ۳: نمونه بهینه شده. ۴: نمونه جهش یافته.



شکل ۳. تخلیص پلاسمید. ۱: مارکر. ۲: پلاسمید تخلیص شده.



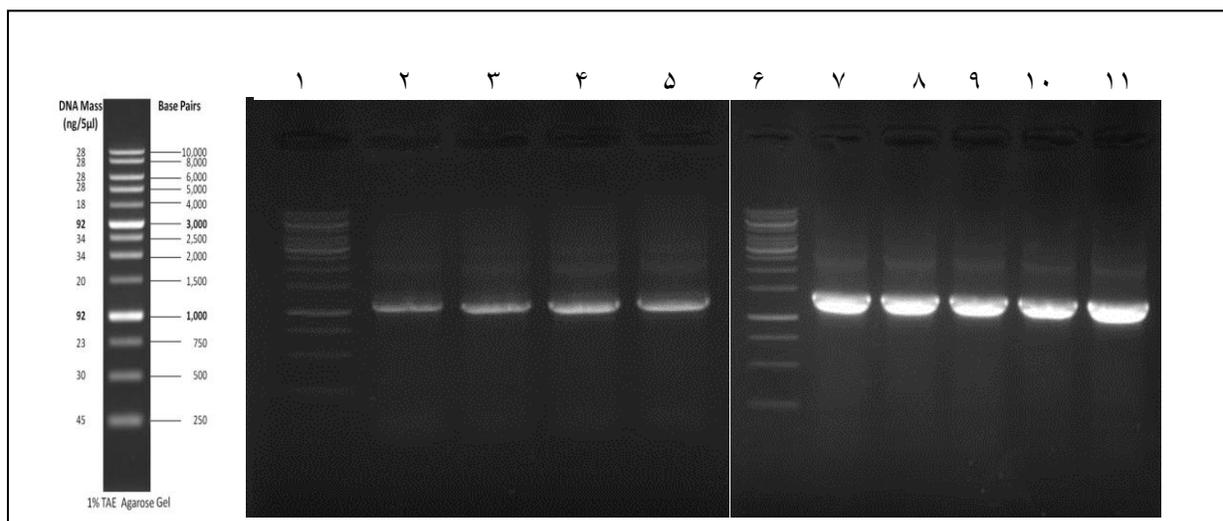
شکل ۴. هضم آنزیمی پلاسمید (pET42a) و ژن ها. ۱: مارکر ، ۲: محصول (PCR) نمونه جهش یافته برش خورده با (Nde1 ,Xho1). ۳: محصول (PCR) نمونه جهش یافته. ۴: پلاسمید تخلیص شده برش خورده با (Nde1 ,Xho1). ۵: پلاسمید تخلیص شده. ۶: مارکر. ۷: محصول (PCR) نمونه طبیعی. ۸: محصول (PCR) نمونه طبیعی برش خورده با (Nde1 ,Xho1)

بیان پروتئین‌های نو ترکیب (SDS-PAGE)

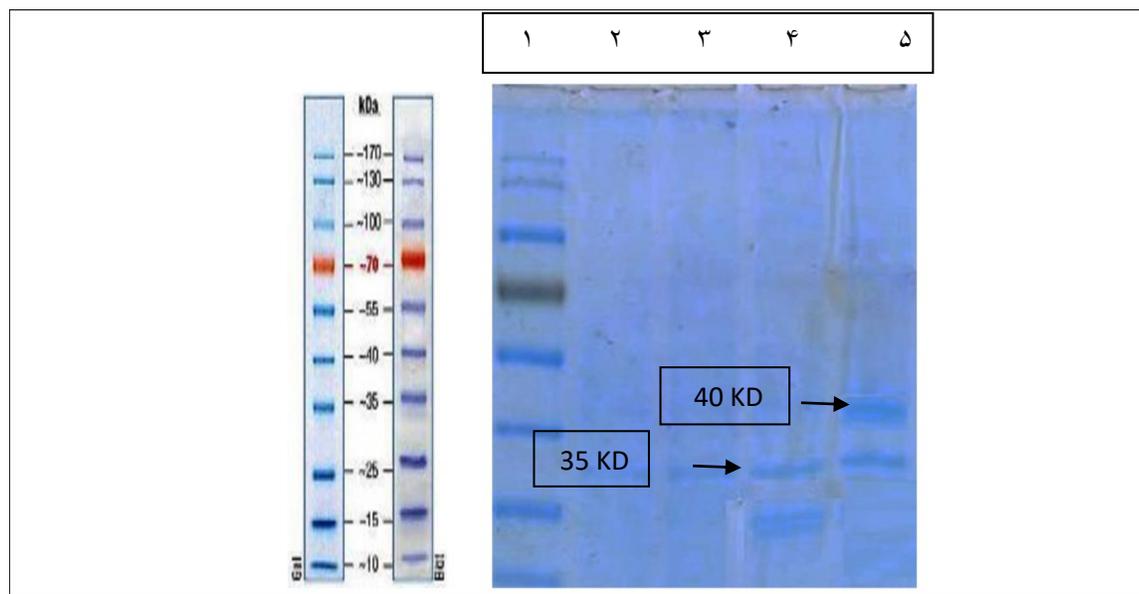
برای بررسی بیان پروتئین‌های طبیعی و جهش یافته، سلول‌های ترانسفورم شده با سونیکاسیون لیز شدند و عصاره‌های محلول بر روی (SDS-PAGE) بارگذاری شد. نتایج نشان داد که پروتئین‌های نو ترکیب با وزن مولکولی تقریبی ۳۵-۴۰ kDa به طور موفقیت آمیز بیان شده‌اند (شکل ۶).

تایید کلنی‌های نو ترکیب با (PCR)

برای شناسایی کلنی‌های حاوی ژن مورد نظر، روش کلنی (PCR) به کار رفت. محصولات (PCR) روی ژل آگارز بررسی شدند و کلنی‌های صحیح انتخاب شدند. (شکل ۵) این نتایج نشان‌دهنده موفقیت ترانسفورماسیون و وارد شدن ژن نو ترکیب به سلول‌های میزبان بود.



شکل ۵. کلنی (PCR) نمونه های طبیعی و جهش یافته. چاهک ۱ و ۶: مارکر. چاهک ۲ تا ۵: کلنی حاوی نمونه طبیعی. چاهک ۷ تا ۱۱: کلنی حاوی نمونه جهش یافته.



شکل ۶. تصویر (SDS-PAGE) لیز سلولی تام. چاهک شماره ۱: مارکر. چاهک شماره ۲ و ۳: لیز سلولی تام باکتری فاقد پلاسمید. چاهک شماره ۴: لیز سلولی تام باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب ژن طبیعی. چاهک شماره ۵: لیز سلولی تام باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب ژن جهش یافته.

سنجش فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیم در شرایط مختلف غلظت (IPTG) (۰/۱ تا ۱ میلی مولار)، زمان القا (۵، ۷، ۱۶ ساعت) و دما (۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد) بررسی شد

بیشترین فعالیت آنزیمی برای (IPTG) ۰/۴ میلی مولار، نمونه های شماره ۴، ۵ و ۶ بیشترین فعالیت را داشتند
 زمان ۵ ساعت و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد. (شکل)
 (جدول ۳ تا ۵) بررسی کلونی های مختلف نشان داد که

جدول ۳. سنجش فعالیت در غلظت های مختلف IPTG

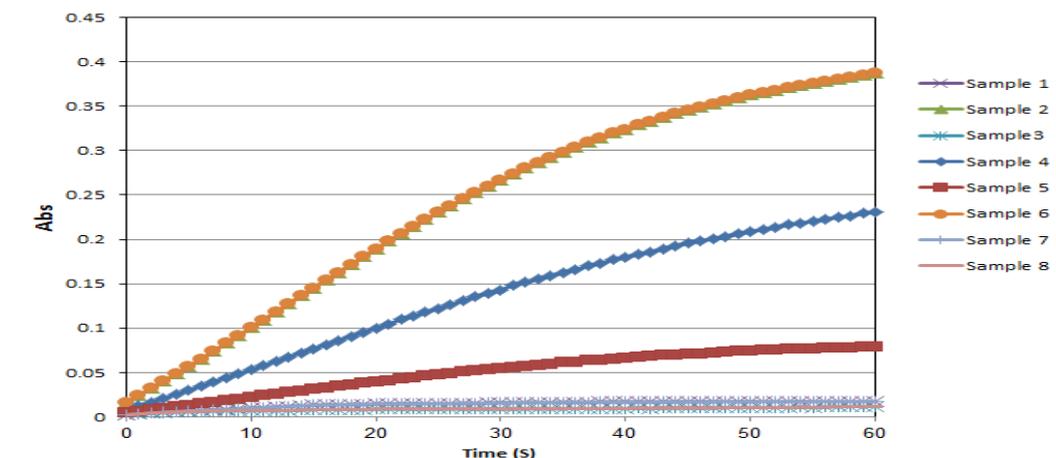
۱	۰/۹	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۵	۰/۴	۰/۳	۰/۲	۰/۱	غلظت IPTG
۰/۱۶۱	۰/۱۵۸	۰/۱۵۴	۰/۱۵۱	۰/۱۲۱	۰/۱۵۲	۰/۱۶۲	۰/۱۵۱	۰/۱۵۰	۰/۱۴۰	فعالیت

جدول ۴. سنجش فعالیت در زمان های مختلف

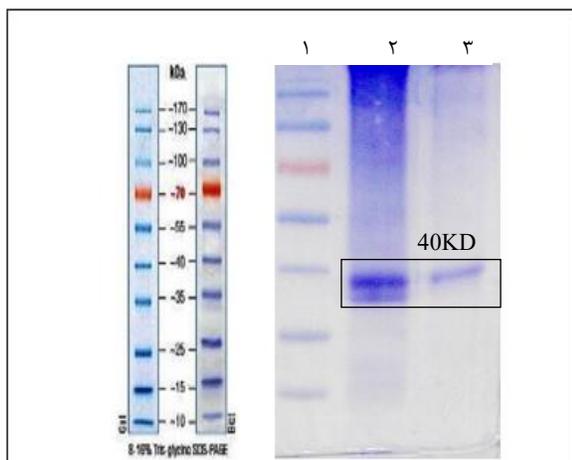
۱۶ ساعت	۷ ساعت	۵ ساعت	زمان
۰/۱۴۷	۰/۱۴۵	۰/۱۴۵	فعالیت نمونه ۱
۰/۱۵۵	۰/۱۵۴	۰/۱۵۳	فعالیت نمونه ۲

جدول ۵. سنجش فعالیت در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد

دما	دمای ۲۵ درجه سانتی گراد	دمای ۳۷ درجه سانتی گراد
فعالیت نمونه ۱	۰/۱۴۲	۰/۰۷۰
فعالیت نمونه ۲	۰/۱۴۷	۰/۰۶۵



شکل ۶. نمودار سنجش فعالیت تعدادی از کلنی های ترانسفورم شده مختلف نمونه طبیعی

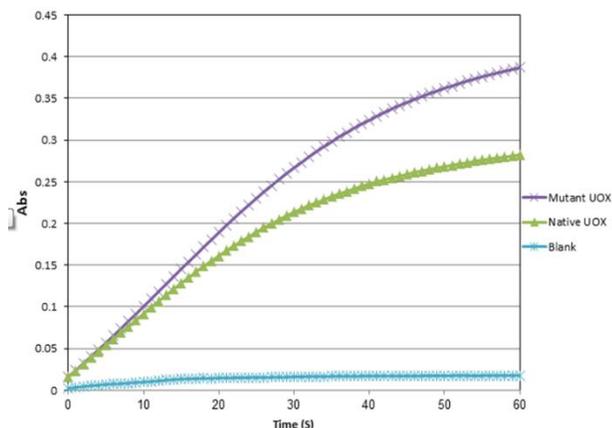


شکل ۷. تصویر (SDS-PAGE) از تخلیص نمونه جهش یافته. شماره ۱: مارکر. شماره ۲ و ۳: نمونه جهش یافته تخلیص شده.

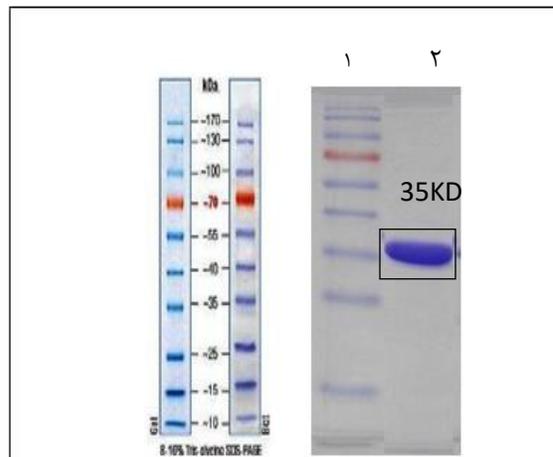
تخلیص پروتئین های نو ترکیب SDS-PAGE

پروتئین های نو ترکیب با رزین Nickel-IDA (Agarose) تخلیص شدند و بر روی (SDS-PAGE) بررسی گردیدند. باندهای واضح و با شدت مناسب در محدوده وزن مولکولی مورد انتظار مشاهده شد، که نشان دهنده موفقیت تخلیص و خلوص پروتئین است. (شکل

های ۷ و ۸)



شکل ۹. نمودار سنجش فعالیت نمونه های تخلیص شده طبیعی و جهش یافته.



شکل ۸. تصویر (SDS-PAGE) از تخلیص نمونه طبیعی. شماره ۱: مارکر. شماره ۲: نمونه طبیعی تخلیص شده.

سنجش فعالیت آنزیمی نمونه های تخلیص

شده

فعالیت آنزیمی نمونه های تخلیص شده نشان داد که پروتئین جهش یافته نسبت به نمونه طبیعی جذب بالاتری دارد، که حاکی از بهبود عملکرد آنزیم در نمونه جهش یافته است. (شکل ۹)

بررسی خصوصیات کینتیکی

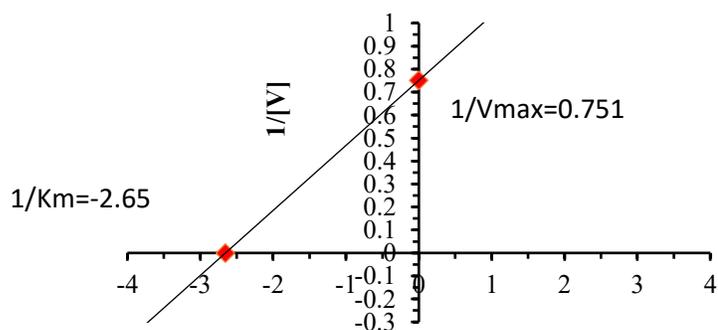
با اندازه گیری سرعت واکنش در غلظت های مختلف سوبسترا و ترسیم منحنی های لین-ویوربرگ، پارامترهای کینتیکی پروتئین ها محاسبه شد. (شکل های ۱۰ و ۱۱) نتایج نشان داد که نمونه جهش یافته دارای ($K_m = 0/39$) میلی مولار و ($V_{max} = 1/33 \mu\text{mol}/\text{min}$) است، در حالی که نمونه طبیعی دارای ($K_m = 2.48$) میلی مولار و ($V_{max} = 3/376 \mu\text{mol}/\text{min}$) بود (جدول های ۶ و ۷). کاهش مقدار (K_m) و افزایش کارایی نشان دهنده (Affinity) بالاتر و فعالیت آنزیمی بهبود یافته در نمونه جهش یافته است.

جدول ۶. اندازه گیری پارامترهای کینتیکی ژن جهش یافته

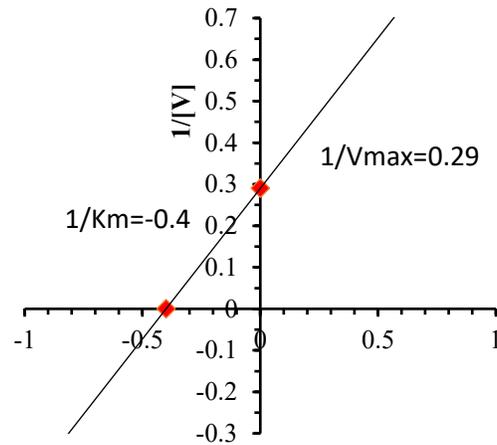
ردیف	غلظت سوبسترا [S] (میلی مولار)	1/S mol	Abs	V u/ml	1/v u/ml
۱	۱	۱	۰/۱۸۷	۰/۹۵۴	۱/۰۴۸
۲	۲	۰/۵	۰/۲۲۲	۱/۱۳۲	۰/۸۸۳
۳	۳	۰/۳۳	۰/۲۳۱	۱/۱۷۸	۰/۸۴۸

جدول ۷. اندازه گیری پارامترهای کینتیکی ژن طبیعی

ردیف	غلظت سوبسترا [S] (میلی مولار)	1/S mol	Abs	V u/ml	1/v u/ml
۱	۰/۵	۲	۰/۱۲۶	۰/۶۴۲	۱/۵۵۷
۲	۰/۷۵	۱/۳۳	۰/۱۵۱	۰/۷۷۰	۱/۲۹۸
۳	۱	۱	۰/۱۸۶	۰/۹۴۸	۱/۰۵۴
۴	۱/۲۵	۰/۸	۰/۱۹۶	۱	۱
۵	۱/۵	۰/۶۶	۰/۲۶۹	۱/۳۷۲	۰/۷۲۸



شکل ۱۰. منحنی لین ویور برگ ژن جهش یافته مربوط به ۳ غلظت سوبسترا



شکل ۱۱. منحنی لین ویوربرگ ژن طبیعی مربوط به ۵ غلظت سوبسترا

بحث و نتیجه گیری

مهندسی پروتئین، به یک دغدغه جدی در حوزه زیست فناوری دارویی تبدیل شده است (۱۴).

در سالهای گذشته، پژوهش‌های متعددی بر تولید، بیان و تخلیص اوریکاز از منابع میکروبی مختلف متمرکز بوده‌اند. بیان اوریکاز در سیستم‌های یوکاریوتی نظیر (ساکارومایسس سرویزیه و پیچیا پاستوریز) با هدف افزایش پایداری و بهبود تاخوردگی پروتئین انجام شده است؛ با این حال، این سیستم‌ها اغلب با هزینه‌های بالا، زمان‌بر بودن فرآیند تولید و پیچیدگی‌های فنی همراه بوده‌اند (۱۵). در مقابل، استفاده از *اشرشیا کلی* به‌عنوان سیستم بیانی، به دلیل سرعت بالا، هزینه کمتر و سهولت دستکاری ژنتیکی،

هیپراوریسمی به‌عنوان یک اختلال متابولیکی شایع، همواره یکی از چالش‌های مهم در درمان بیماری‌هایی نظیر نقرس، سندرم لیز توموری و برخی اختلالات کلیوی بوده است. اگرچه آنزیم اوریکاز به‌دلیل توانایی تبدیل اسیداوریک کم‌حلالیت به آلانتوئین با حلالیت بالا، گزینه‌ای مؤثر برای کاهش سطح اورات سرم محسوب می‌شود، اما کاربرد درمانی این آنزیم با محدودیت‌های اساسی مواجه است. پایداری پایین، ویژگی‌های کینتیکی نامطلوب، و دشواری در تولید یک فرم بهینه و مقرون‌به‌صرفه، از جمله عواملی هستند که استفاده گسترده از اوریکاز را محدود کرده‌اند. از این رو، بهبود خواص عملکردی این آنزیم از طریق رویکردهای

حال، کاربرد این راهبرد در مورد آنزیم اوریکاز تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته و خلأ مشخصی در این زمینه وجود داشته است.

در مطالعه حاضر، روی آنزیم اوریکاز *آسپیرژیلوس فلاووس* عمل (Pasylation) با افزایش توالی از ۱۰۰ آمینو اسید به انتهای (C-Terminal) انجام شد و سپس نمونه نوترکیب در روند مقایسه ای با آنزیم طبیعی توسط وکتور (pET42a) به باکتری (*BL21/اشرشیا کلی*) ترانسفورم شدند و سپس بیان و تخلیص شدند. نتایج حاصل از تحلیل‌های ساختاری و عملکردی نشان داد که افزودن توالی (PAS)، بدون ایجاد اختلال در ساختار کلی آنزیم، منجر به بهبود قابل توجه ویژگی‌های کینتیکی شده است. کاهش معنی‌دار مقدار (K_m) در آنزیم پاسبیل‌شده نشان‌دهنده افزایش تمایل آنزیم به سوبسترا بوده که از منظر کاربردهای درمانی اهمیت بالایی دارد. این بهبود کینتیکی می‌تواند منجر به کارایی بیشتر آنزیم در غلظت‌های پایین‌تر اسیداوریک و در نتیجه اثربخشی بهتر در شرایط فیزیولوژیک شود.

علاوه بر این، مقایسه عملکرد آنزیم پاسبیل‌شده با فرم طبیعی نشان داد که اصلاح ساختاری انجام‌شده، مزیت عملکردی مشخصی ایجاد کرده است. این یافته‌ها حاکی از آن است که پاسبیل‌سیون می‌تواند با کاهش اثرات منفی ناشی از ناپایداری ساختاری و تجمع پروتئینی، عملکرد

مورد توجه گسترده قرار گرفته است، هرچند مشکلاتی مانند تجمع پروتئینی، کاهش پایداری و افت کارایی آنزیمی همچنان گزارش شده‌اند (۱۶).

از سوی دیگر، مطالعات پیشین عمدتاً بر بررسی شرایط بهینه فعالیت، پایداری حرارتی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اوریکاز متمرکز بوده‌اند. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که بسیاری از اوریکازهای طبیعی در دماهای فیزیولوژیک یا بالاتر، دچار کاهش سریع فعالیت می‌شوند و نیمه‌عمر کوتاهی دارند. همچنین بررسی داده‌های موجود نشان می‌دهد که اطلاعات مربوط به پارامترهای کینتیکی اوریکاز، به‌ویژه (K_m) و (V_{max})، محدود و در برخی موارد نامطلوب است؛ به‌طوری‌که مقادیر بالای (K_m) گزارش‌شده در مطالعات قبلی بیانگر تمایل کم آنزیم به سوبسترا و کارایی پایین‌تر در شرایط درمانی است. این مسئله نشان می‌دهد که صرف تولید اوریکاز نوترکیب، بدون بهبود هدفمند ویژگی‌های کینتیکی، نمی‌تواند پاسخگوی نیازهای درمانی باشد (۱۷، ۱۸).

در این میان، استفاده از رویکردهای نوین مهندسی پروتئین می‌تواند راهکاری مؤثر برای غلبه بر محدودیت‌های موجود باشد. پاسبیل‌سیون (PASylation) به‌عنوان یک روش اصلاح ساختاری نوین، با اتصال توالی‌های غنی از پرولین، آلانین و سرین، توانسته است در برخی پروتئین‌های دارویی موجب بهبود پایداری، حلالیت و عملکرد زیستی شود. با این

نهایی قابلیت‌های درمانی این آنزیم ضروری است. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر در جهت توسعه نسل جدیدی از اوریکازهای مهندسی‌شده با کاربردهای درمانی گسترده‌تر باشد.

آنزیم را بهبود بخشد. از این منظر، نتایج این مطالعه نه تنها در راستای بهبود اوریکاز دارویی قابل تفسیر است، بلکه می‌تواند به‌عنوان الگویی برای اصلاح سایر آنزیم‌های درمانی نیز مورد توجه قرار گیرد.

با این حال، انجام مطالعات تکمیلی شامل بررسی پایداری بلندمدت، ایمنی‌زایی و ارزیابی‌های درون‌تنی، برای تأیید

منابع

- Galbán J, Andreu Y, Almenara MJ, de Marcos S, Castillo JR. Direct determination of uric acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase. *Talanta*. 2001;54(5):847-54.
- Hongoh Y, Sasaki T, Ishikawa H. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding a uricase from the yeast-like symbiont of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000;30(2):173-82.
- Oda M, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol*. 2002;19(5):640-53.
- Oldfield V, Perry CM. Rasburicase: a review of its use in the management of anticancer therapy-induced hyperuricaemia. *Drugs*. 2006;66(4):529-45.
- Richette P, Brière C, Hoenen-Clavert V, Loeuille D, Bardin T. Rasburicase for tophaceous gout not treatable with allopurinol: an exploratory study. *J Rheumatol*. 2007;34(10):2093-8.
- Zhou Y, Zhang M, He D, Hu X, Xiong H, Wu J, et al. Uricase alkaline enzymosomes with enhanced stabilities and anti-hyperuricemia effects induced by favorable microenvironmental changes. *Sci Rep*. 2016;7:20136.
- Binder U, Skerra A. PASylation®: A versatile technology to extend drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2017;31:10.Y-
- Ahmadpour S, Hosseinimehr SJ. PASylation as a Powerful Technology for Improving the Pharmacokinetic Properties of Biopharmaceuticals. *Curr Drug Deliv*. 2018;15(3):331-41.
- Schlapschy M, Binder U, Börger C, Theobald I, Wachinger K, Kisling S, et

- al .PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel*. 2013;26(8):489-501.
10. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5695-9.
 11. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volume 3, pages A2. 2–A2. 4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 2001.
 12. Alshareef A, El-Readi MZ, Neyaz LA, Abulreesh HH, Alsaigh AA, Khalel AF, et al. Isolation and Characterization of Highly Active Uricase from *Alcaligenes* spp. Strain UR1. *Pol J Microbiol*. 2025;74(1):106-29.
 13. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel Jr JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*. 1967;28(5):815-20.
 14. Cammalleri L, Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *Int J Med Sci*. 2007;4(2):83-93.
 15. Fazel R, Zarei N, Ghaemi N, Namvaran MM, Enayati S, Mirabzadeh Ardakani E, et al. Cloning and expression of *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Pichia pastoris*. *Springerplus*. 2014;3:395.
 16. Li J, Chen Z, Hou L, Fan H, Weng S, Xu C, et al. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2006;49(1):55-9.
 17. Liao F, Zhao YS, Zhao LN, Tao J, Zhu XY ,Liu L. Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(6):497-502.
 18. Fraisse L, Bonnet MC, de Farcy JP, Agut C, Dersigny D, Bayol A. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters. *Anal Biochem*. 2002;309(2):173-9.

پروبیوتیک‌ها به عنوان تعدیل‌کننده‌های میکروبی بیخوابی: مروری بر نقش باکتری‌های لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم

صبا سادات صابری^۱، سهیلا افشاری آزاد^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بی‌خوابی به‌عنوان یکی از رایج‌ترین اختلالات خواب، با تغییرات در عملکرد میکروبیوتای روده ارتباط قوی دارد. در دهه اخیر، مطالعات نشان داده‌اند که نقص در محور روده-مغز (Gut_BrainAxis)، نقش اساسی در پاتوفیزیولوژی بی‌خوابی (Insomnia) ایفا می‌کند. این مقاله، یافته‌های موجود در مورد اثرات دو گونه مهم پروبیوتیکی، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (*Lactobacillus helveticus*) و بیفیدوباکتریوم لانگوم (*Bifidobacterium longum*) بر تعدیل اختلالات خواب و مکانیسم‌های بیولوژیکی را بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: جستجو در پایگاه‌های داده بین‌المللی و داخلی شامل Scopus، PubMed، Google Scholar و SID با استفاده از کلیدواژه‌های تخصصی لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم، بی‌خوابی، کیفیت خواب (Sleep Quality)، محور روده-مغز انجام شد. بازه زمانی ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۴ مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از غربالگری، ۳۰ مطالعه نهایی واجد شرایط بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: تحقیقات نشان می‌دهد سویه‌های اختصاصی لاکتوباسیلوس هلوتیکوس R۰۰۵۲ و بیفیدوباکتریوم لانگوم R۰۱۷۵، ۱۷۱۴ از طریق فرآیندهای مختلفی می‌توانند بر کارایی خواب مؤثر باشند؛ از جمله تنظیم انتقال‌دهنده‌های عصبی در چرخه خواب-بیداری، کاهش بیومارکرهای زیستی التهابی مانند فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) که با اختلالات خواب مرتبط هستند و افزایش تولید اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر که بر دستگاه عصبی مرکزی تأثیر می‌گذارند. در مطالعات انسانی، مصرف این پروبیوتیک‌ها سبب بهبود قابل توجه در شاخص‌های خواب شده است. در حالی که مطالعات حیوانی تأثیر مثبت این پروبیوتیک‌ها را بر کاهش زمان شروع خواب و افزایش مدت خواب عمیق نشان دادند.

نتیجه‌گیری: باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم می‌توانند گزینه‌های درمانی امیدوارکننده‌ای برای اختلالات خواب باشند. با این وجود، تنوع در روش مطالعه، تفاوت در دوزهای مصرفی و مدت زمان مداخلات، پژوهش‌های طولانی‌مدت را برای تثبیت نتایج ضروری می‌سازد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، بی‌خوابی، محور روده-مغز، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس، بیفیدوباکتریوم لانگوم

Probiotics as microbial modulators of insomnia: A review of the role of *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*

Saba Sadat Sabery¹, Soheyla Afshari Azad^{2*}

1. Undergraduate student, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, North Tehran, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, North Tehran, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Insomnia, as one of the most prevalent sleep disorders, is strongly linked to alterations in the gut microbiota function. In the past decade, studies have indicated that a dysfunction in the Gut-Brain Axis plays a pivotal role in the pathophysiology of insomnia. This systematic review examines the existing findings regarding the effects of two important probiotic species, *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*, on the modulation of sleep disorders and their underlying biological mechanisms.

Methods: A systematic search was conducted across international and domestic databases, including Scopus, PubMed, Google Scholar, and SID (Scientific Information Database), using specialized keywords: *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, insomnia, sleep quality, and Gut-Brain Axis. The search spanned the period from 2019 to 2024. Following the screening process, 30 final eligible studies were selected for review.

Result: Research indicates that specific strains, such as *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175/1714, can effectively influence sleep efficiency through various processes. These include the regulation of neurotransmitters in the sleep-wake cycle, the reduction of inflammatory biomarkers associated with sleep disorders, such as Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), and the enhanced production of short-chain fatty acids that impact the central nervous system. In human studies, the consumption of these probiotics led to significant improvements in sleep quality. Meanwhile, animal studies demonstrated the positive effect of these probiotics on reducing sleep onset latency and increasing the duration of deep sleep.

Conclusion: The probiotic bacteria *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* represent promising therapeutic options for sleep disorders. Nevertheless, the variability in study methodologies, differences in dosages, and intervention durations necessitate longer-term research to solidify and confirm these results.

Keywords: Probiotic, Insomnia, Gut-Brain Axis, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*

مقدمه

دستگاه گوارش و سیستم عصبی مرکزی، جایگاهی محوری در پاتوفیزیولوژی اختلالات خواب یافته است (۱ و ۸). این محور از طریق مسیرهای عصبی (عصب واگ)، سیگنالینگ اندوکرین، هورمون‌ها، نوروپپتیدها و متابولیت‌ها، سیگنال‌ها را بین میکروبیوتای روده و سیستم عصبی مرکزی مبادله می‌کند (۱۰ و ۹ و ۸). میکروبیوتای روده به‌عنوان یک سیستم متابولیک خارجی، از طریق تولید فرآورده‌های متابولیکی فعال، تعدیل سیستم ایمنی و تقویت سد روده‌ای عمل می‌کند. این فرایند به‌طور عمیق بر هموستازی عصبی و ریتم سیرکادین تأثیر می‌گذارد (۸ و ۶).

شواهد متاژنومیکس و متابولومیکس نشان‌دهنده دیسبیوزیس (Dysbiosis) در بی‌خوابی و اختلالات متابولیک است. این دیسبیوزیس شامل کاهش تنوع میکروبی، تغییر نسبت Bacteroides به Firmicutes و کاهش جمعیت‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدیوباکتریوم می‌باشد (۶). این یافته‌ها نقش محوری میکروبیوتا را به‌عنوان واسطه‌ای بین اختلالات خواب و پاتولوژی متابولیک از طریق تنظیم محور روده-مغز که شبکه‌ای دوسویه است را تأیید می‌کند و توجه علمی محکمی برای کاربرد پروبیوتیک‌های هدفمند فراهم می‌آورد (۸ و ۵).

سویه‌های متعلق به لاکتوباسیلوسه (Lactobacillaceae) به‌ویژه لاکتوباسیلوس (Lactobacillus spp) و بیفیدیوباکتریوم (Bifidobacterium spp) به‌دلیل توانایی بقا در دستگاه گوارش و فعالیت متابولیک اختصاصی، کاندیداهای اصلی هستند (۱۱). مصرف پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس هلویتیکوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم منجر به بهبود کیفیت خواب می‌شود، اگرچه تغییر معناداری در سطوح گیرنده کانابینوئید نوع ۲ (Cannabinoid Receptor Type 2) یا آمید هیدرولاز اسید چرب (Fatty

mikrobiota) نقش اساسی در سلامت انسان ایفا می‌کند و همچنین با طیف وسیعی از بیماری‌های عصبی-روانی مرتبط است (۲ و ۱). بی‌خوابی (Insomnia)، یکی از شایع‌ترین اختلالات خواب، طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization) حدود ۵۰-۳۰ بزرگسالان را مبتلا می‌کند (۳). این اختلال نه تنها کیفیت زندگی را کاهش می‌دهد (۴)، بلکه به‌عنوان یک عامل خطر مستقل در پاتوژنز بیماری‌های قلبی-عروقی، اختلالات متابولیک شامل دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک، و ناهنجاری‌های روان‌پزشکی مانند افسردگی و اضطراب عمل می‌کند (۶ و ۳). درمان‌های فعلی بی‌خوابی مانند داروهای خواب‌آور، عمدتاً علائم را تسکین می‌دهند و با عوارض جانبی چون وابستگی یا اختلال در میکروبیوتا همراه هستند (۲ و ۱). محدودیت‌های ذاتی درمان‌های فارماکولوژیکی رایج شامل وابستگی، تحمل دارویی و عوارض جانبی عصبی، ضرورت توسعه مداخلات ایمن و هدفمند بر اساس پاتوفیزیولوژی را پررنگ می‌سازد (۷ و ۲). در سال‌های اخیر، پیدایش محور روده-مغز به‌عنوان شبکه‌ای حیاتی بین

نویسنده ی مسئول: استادیار، گروه میکروب

شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک: mdm_358@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۸/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۹/۰۳

درحالی که مطالعات حیوانی افزایش مدت زمان خواب را نشان می دهند. همچنین برخی مطالعات بهبود کارایی خواب و عملکرد روزانه را نیز مشاهده کردند (۱۶ و ۱۵ و ۱۳ و ۱۲).

اهداف این مرور سیستماتیک:

۱. تحلیل مکانیسم های میکروبی: با تأکید بر مسیرهای مولکولی (GABAergic)، سیستم کانابینوئید درونزا (eCB)، گیرنده های جفت شده با پروتئین جی اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA-GPCR)، و مسیر گیرنده ی شبه تول (TLR-سایتوکاین)) و اثرات سویه های خاص لاکتوباسیلوس هلویتیکوس R۰۰۵۲ و بیفیدیوباکتریوم لانگوم R۰۱۷۵ در مدل های برون تنی و درون تنی (۱۴ و ۱۲ و ۱۱).

۲. مرور سیستماتیک شواهد بالینی: با تأکید بر طراحی مطالعات، دوز (CFU)، مدت مداخله، و معیارهای پیامد خواب (پلی سومنوگرافی (Polysomnography)، پرسشنامه های اعتبارسنجی شده) (۲۰ و ۱۹ و ۱۸ و ۱۷).

۳. شناسایی شکاف های دانش میکروبیولوژیکی و پیشنهاد مسیرهای پژوهشی آینده: اولویت بندی مطالعات آینده در زمینه ژنومیکس کاربردی، پروتئومیکس میزبان-میکروب، مهندسی متابولیک سویه های پروبیوتیک، و همچنین توسعه فرمولاسیون های پروبیوتیکی هدفمند برای بی خوابی (۸ و ۷ و ۲).

(Acid Amide Hydrolase) مشاهده نشد. این اثرات احتمالاً از طریق مکانیسم های محور روده-مغز ایجاد می شوند (۱۲ و ۱۱). در میان روان زیستی ها، دو سویه اختصاصی لاکتوباسیلوس هلویتیکوس سویه R۰۰۵۲ و بیفیدیوباکتریوم لانگوم سویه R۰۱۷۵، به دلیل شواهد نوروبیولوژیک قوی در مدل های حیوانی و انسانی مرتبط با خواب و استرس برجسته هستند (۱۴ و ۱۳ و ۱۲ و ۱۱).

۱. نورومدولاسیون: مطالعات تصویربرداری (fMRI) کاهش فعالیت در کورتکس سینگولیت قدامی و افزایش اتصال عملکردی بین مناطق لیمبیک و مدیال را نشان می دهد (۱۴). این تغییرات عصبی احتمالاً ناشی از تعدیل فعالیت مناطق مغزی مرتبط با استرس و افزایش اتصالات عملکردی بین نواحی فوقانی لیمبیک و ناحیه میانی-شکمی می باشد (۱۵ و ۱۴).

۲. اثرات تعدیل کننده استرس و اضطراب: مکانیسم ها شامل:

الف) سنتز مستقیم گابا (GABA) توسط لاکتوباسیلوس هلویتیکوس R۰۰۵۲

ب) تنظیم سیتوکین های التهابی کاهش فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) و افزایش اینترلوکین-۱۰ (IL-۱۰) (۱۱).

۳. بهبود پارامترهای خواب: در این زمینه مطالعات انسانی بهبود کیفیت خواب با شاخص کیفیت خواب پیتزبورگ (PSQI) و کاهش اختلالات روزانه را گزارش کرده اند،

مواد و روش

جهت مرور شواهد قابل دسترس در رابطه با پروبیوتیکها به عنوان تعدیل کننده های میکروبی با تمرکز بر نقش باکتری های لاکتوباسیلوس هلویتیکوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم جستجوی جامع در هفت پایگاه داده معتبر شامل پایگاه های بین المللی PubMed، Scopus، Web of Science، Noormags، Civilica، SID، Scholar Google انجام شد.

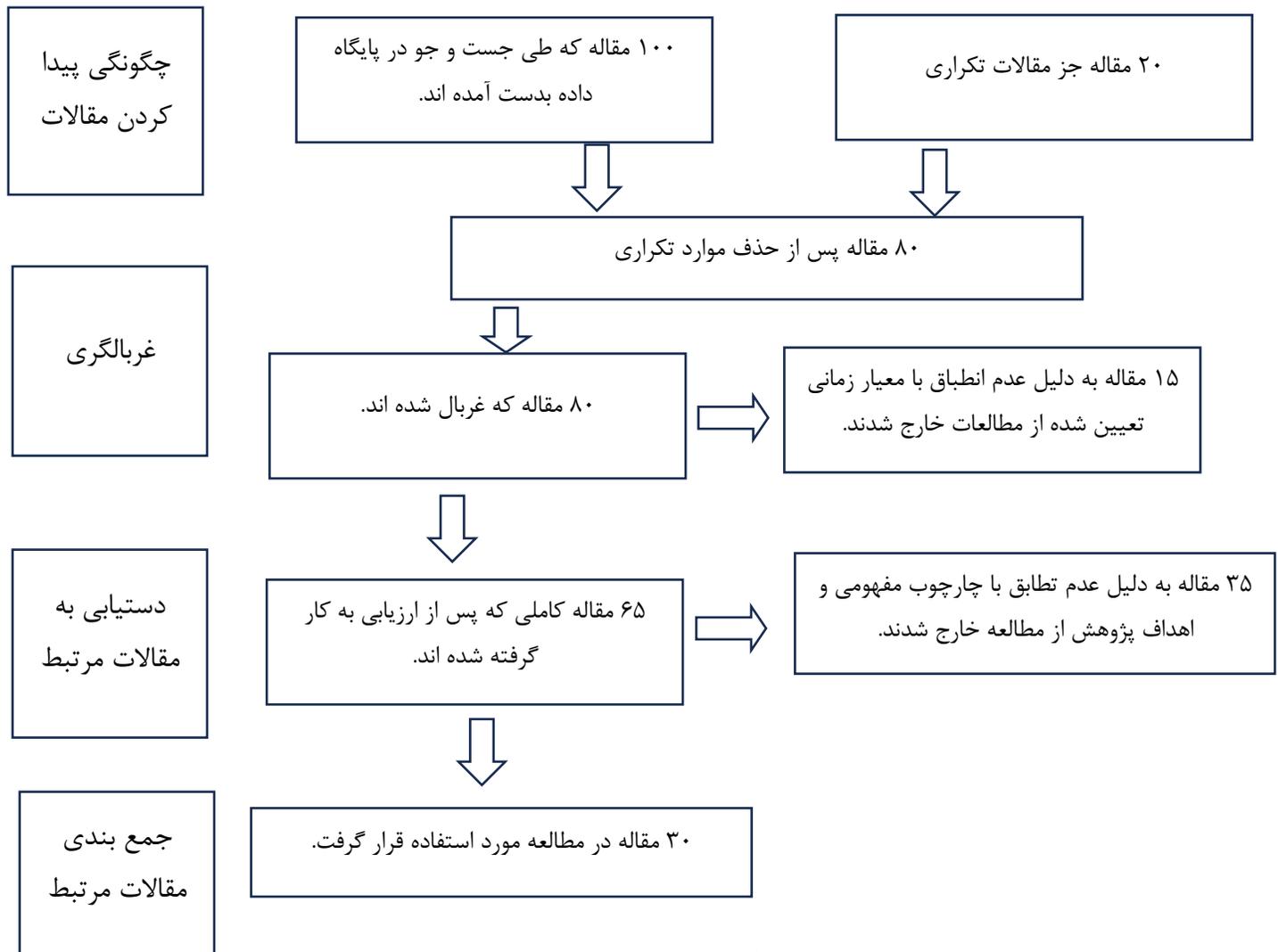
گروه اول شامل: سویه های پروبیوتی (*Lactobacillus helveticus* OR *Bifidobacterium longum*)

گروه دوم اختلالات خواب (Insomnia OR sleep initiation and maintenance disorders)

گروه سوم مکانیسم های عصبی-روده ای (gut-brain axis (GABA receptors) OR بود. همچنین از کلیدواژه های فارسی معادل شامل پروبیوتیکها، بی خوابی و محور روده-

نمونه‌ها، پروتکل‌های مداخله (دوز و مدت زمان)، تغییرات ترکیب میکروبیوتا (کاهش /انتروباکتریاسه‌ها و افزایش لاکتوباسیل‌ها)، سطوح نوروترانسمیترها (گابا و اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر) و پارامترهای خواب (شاخص کیفیت خواب پیترزبورگ (PSQI) و پلی‌سومنوگرافی) انجام پذیرفت. تحلیل داده‌ها با رویکرد کیفی و تمرکز بر سه سازوکار اصلی نوروبیولوژیک (تأثیر بر محور تریپتوفان-سروتونین و تنظیم گیرنده‌های گابا)، تغییرات میکروبیولوژیک در میکروبیوتای روده و پیامدهای رفتاری (بهبود کیفیت خواب و عملکرد روزانه) صورت گرفت.

مغز برای جستجو در پایگاه‌های داخلی استفاده شد. معیارهای ورود مطالعات محدود به بازه زمانی ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۵، دسترسی آزاد به متن کامل و تمرکز بر مطالعات انسانی یا حیوانی مرتبط با دو سویه هدف بود. فرآیند غربالگری براساس پروتکل PRISMA ۲۰۲۰ آغاز گردید که از ۱۰۰ مطالعه اولیه شناسایی شده، پس از حذف ۲۰ مورد تکراری با استفاده از نرم‌افزار EndNote X۹ و تأیید دستی، ۸۰ مطالعه وارد مرحله غربالگری عنوان و چکیده شدند. پس از این مرحله ۶۵ مطالعه برای ارزیابی متن کامل انتخاب شدند که از این تعداد ۳۰ مطالعه تأیید شدند. استخراج داده‌ها با تمرکز بر متغیرهای کلیدی شامل ویژگی‌های



۱. نمودار جریان پریسمای پژوهش

یافته ها

مؤثر برای کاهش التهاب سیستمیک (مانند $TNF-\alpha$ و $IL-6$) و سطح استرس اکسیداتیو است (۸ و ۶).

۳. اثرات هم‌افزایی سویه‌ها: یافته‌ها نشان می‌دهد که مصرف ترکیبی لاکتوباسیلوس هلووتیکوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم می‌تواند منجر به اثرات قوی‌تر و معنادارتری در مقایسه با مصرف انفرادی سویه‌ها شود. این برتری به‌ویژه در تسکین علائم اضطراب و بهبود کارایی خواب، عمل مؤثرتری دارد (۱۴ و ۱۱).

۴. ارتباط با اختلالات چند ابتلایی (Comorbidities): بر اساس یافته‌های پژوهشی، به‌نظر می‌رسد بهبود خواب ناشی از مصرف پروبیوتیک در افرادی که مشکلات چند ابتلایی دارند (مانند استرس مزمن، اضطراب و افسردگی)، بسیار بارزتر است (۲۱ و ۱۳ و ۱۲).

۵. ایمنی و تحمل‌پذیری: اگرچه متآنالیزهای مربوط به سویه‌های پروبیوتیکی مورد مطالعه، به‌ویژه بیفیدیوباکتریوم لانگوم ۱۷۱۴، از نظر ایمنی ارزیابی شدند، با این وجود در کارآزمایی‌های بالینی که صورت گرفت گزارش شده است که بروز عوارض جانبی در مصرف‌کنندگان پروبیوتیک از نظر آماری تفاوت معناداری با گروه دارونما نداشته است. این یافته‌ها، سطح ایمنی مناسب برای استفاده از پروبیوتیک‌ها در مدیریت اختلالات خواب را تأیید می‌کند (۱۸ و ۱۶).

۶. شکاف‌های دانش: اگرچه داده‌های موجود امیدوارکننده است، اما تدوین پروتکل‌های درمانی مؤثر مستلزم پژوهش‌های آینده برای تعیین معیارهای استاندارد (مانند دوز و مدت زمان بهینه مصرف)، شناسایی سویه‌های خاص با بیشترین اثربخشی و ارزیابی کارایی آن‌ها در جمعیت‌های مختلف است (۴ و ۳).

تحقیقات اخیر، شواهد قابل توجهی از اثر تعدیل‌کنندگی پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه سویه‌های لاکتوباسیلوس هلووتیکوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم، بر کیفیت خواب از طریق ارتباط پیچیده روده-مغز را نشان می‌دهد.

۱. بهبود شاخص‌های خواب: شواهد قابل توجهی در رابطه با مصرف مکمل‌های حاوی سویه‌های لاکتوباسیلوس هلووتیکوس ۲۰۰۵۲ و بیفیدیوباکتریوم لانگوم ۱۷۱۴ و ۱۷۵۰ R به‌طور معناداری باعث بهبود شاخص کیفیت ذهنی خواب، افزایش مدت خواب کل و کاهش نمره شاخص کیفیت خواب می‌شود. این یافته‌ها توسط کارآزمایی‌های بالینی متعدد تأیید شده است (۲۰ و ۱۸ و ۱۶). به عنوان مثال، مصرف بیفیدیوباکتریوم لانگوم ۱۷۱۴ به مدت ۴ هفته در بزرگسالان سالم با اختلالات خواب، به صورت قابل ملاحظه‌ای موجب کاهش عملکرد روزانه و بهبود کیفیت خواب ذهنی ناشی از خواب آلودگی در مقایسه با گروه دارونما شد. همچنین پس از ۸ هفته، ارتقاء در عملکرد اجتماعی و سطح انرژی مشاهده گردید (۱۶). این متآنالیز نشان می‌دهد ترکیبات چندسویه حاوی این دو باکتری منجر به ارتقاء در نمره PSQI می‌شود (۲۰ و ۱۸).

۲. مکانیسم‌های عمل: باکتری‌های لاکتوباسیلوس هلووتیکوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم تأثیرات مؤثری را از طریق محور روده-مغز بر خواب نشان می‌دهند. دو سویه پروبیوتیکی با تعدیل میکروبیوتای روده و تولید متابولیت‌های زیست‌فعال می‌توانند از طریق کاهش پاسخ مغز به استرس کیفیت خواب را بهبود بدهند (۱۴ و ۱۱). به‌علاوه، تنظیم متابولیسم تریپتوفان-سروتونین-ملاتونین به‌عنوان یک راهکار احتمالی برای بیفیدیوباکتریوم لانگوم در نظر گرفته می‌شود (۲۲ و ۲). تقویت سد روده‌ای نیز محرکی

بحث

می‌توانند از طریق فعالیت خود بر کیفیت خواب مؤثر باشند. این تأثیر از مسیرهایی همچون تنظیم عملکرد محور HPA، کاهش پاسخ‌های التهابی و تغییر در انتقال پیام‌های عصبی صورت می‌پذیرد (۴). میکروبیوتای روده با بیوسنتز اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر (SCFA) همچون بوتیرات، می‌تواند به کاهش التهاب و تقویت سد خونی-روده‌ای کمک نماید. این عملکرد، فاکتورهای لازم برای تولید نوروترانسمیترهای درون‌زا در بدن ایجاد می‌کند (۸). فرآورده‌های متابولیکی می‌توانند عصب واگ را فعال سازند و سیگنال‌هایی از گیرنده‌های عصب واگ به صورت مستقیم به مغز انتقال دهند (۲۲ و ۱). یکی از راهکارهای مهم میکروبیوم روده، تعدیل التهاب سیستمیک است. این باکتری‌ها از طریق ارتباط دو طرفه با سلول‌های ایمنی فرد و با تغییراتی در ترشح سیتوکین‌ها، التهاب را تعدیل می‌نمایند. این کانال جزء مهمی از شبکه ارتباطی محور روده-مغز محسوب می‌شود (۹). تحقیقات نشان داده‌اند که تعدیل در سطح فاکتورهای التهابی نظیر IL-6 و TNF- α سبب کاهش قابل توجه در پاسخ‌های التهابی می‌گردد (۱۳ و ۱۱). میان بی‌خوابی و میکروبیوم روده ارتباط دوطرفه وجود دارد که این التهاب مزمن خفیف نقش پل ارتباطی حیاتی را ایفا می‌کند (۹ و ۶). سویه‌های پروبیوتیکی مورد نظر احتمالاً از طریق بهبود عملکرد سد روده‌ای و تعدیل تراکم میکروبی، منجر به متوقف کردن چرخه مخرب می‌گردد (۱۱).

یکپارچه‌سازی مکانیسم‌ها: شواهد موجود از پیچیدگی تعاملات میان محور HPA و متابولیت‌های میکروبی و سیستم ایمنی حکایت دارد که این اجزا به صورت مجزا عمل نکرده، بلکه به صورت یک سیستم یکپارچه با یکدیگر هم‌پوشانی دارند (۴). یک مدل جامع، نقش محوری التهاب را مورد توجه قرار می‌دهد. تا زمانی که التهاب مهار نشود، نمی‌توان عملکرد طبیعی محور HPA و متعاقباً تعدیل تعادل پایدار در سیستم انتقال عصبی را داشت. مکانیسم اثر

بی‌خوابی صرفاً به عنوان اختلال خواب مطرح نمی‌شود، بلکه محور روده-مغز نقش کلیدی در این پدیده دارد. این محور به عنوان پل ارتباطی، کیفیت خواب را به سلامت گوارشی متصل می‌سازد. همچنین، تداخل در عملکرد این محور می‌تواند سبب بروز بی‌تعادلی در سراسر بدن شود (۵ و ۱). اگرچه شواهد حاضر، پتانسیل گونه‌های مشخصی از پروبیوتیک‌ها در تعدیل کیفیت خواب را نشان می‌دهد، با این وجود سازوکار دقیق عملکرد آن‌ها به صورت یک چالش مهم در این حوزه باقی مانده است (۴ و ۳). تعدیل محور HPA: مطالعات نشان می‌دهد فعالیت محور HPA به عنوان یک راهکار اساسی در ارتباط محور روده-مغز مؤثر است. اما شواهد موجود در این زمینه محدود بوده و پاسخ به سؤالات مربوط به چگونگی این تعامل، نیازمند به انجام تحقیقات عمیق‌تری دارد (۱). اگرچه استفاده از پروبیوتیک‌ها موجب تغییراتی در فعالیت مغز شده است، اما تفاوت معناداری در سطح کورتیزول بزاق گزارش نشده است. عدم انطباق بین پاسخ عصبی و هورمونی، این فرضیه را تأیید می‌کند که مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها احتمالاً ابتدا سیستم عصبی مرکزی و سپس نشانگرهای محیطی نمود پیدا می‌کند. یافته‌ها نشان می‌دهد تشخیص نشانگر کورتیزول بزاقی به عنوان شاخص بیوشیمیایی از حساسیت لازم برخوردار نبوده است. به نظر می‌رسد مکانیسم اصلی این اثرات بر عهده مسیرهای مستقل از محور HPA مانند عصب واگ است. به همین دلیل درک کامل این مکانیسم‌ها ضرورت استفاده از روش‌های تصویربرداری عصبی (fMRI) در کنار نشانگرهای سنتی را نشان می‌دهد (۱۴ و ۱).

انتقال عصبی: بر اساس نتایج به دست آمده از مدل SHIME، تولید نوروترانسمیتر گابا (GABA) توسط سویه‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) اثبات شده است (۱۱). مطابق این مقاله، متابولیت‌های میکروبی روده

وجود آورد تا اثرات منحصر به فرد هر سویه به صورت مجزا مشخص گردد (۳ و ۱۸). یافته‌های پژوهشی، مکانیسم تأثیر باکتری‌های لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم در ارتقای کیفیت خواب را تأیید می‌کنند (۱۳). مطالعات نشان می‌دهند تخفیف التهاب سیستمیک، شرط ضروری برای دستیابی به سایر نتایج درمانی محسوب می‌شود (۶ و ۹). اگرچه شواهد فعلی فقط ارتباط میان کیفیت خواب و سلامت میکروبیوم را نشان داده‌اند، اما تا زمانی که تحقیقات آتی رابطه علت و معلولی را به اثبات نرساند، نمی‌توان از این یافته‌ها به عنوان یک راه‌حل بالینی و درمانی بهره‌برداری نمود (۴ و ۶).

پروبیوتیک‌ها از طریق تنظیم میکروبیوم روده مغز و متعادل‌سازی پاسخ‌های ایمنی بدن صورت می‌پذیرد. استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی منجر به کاهش التهاب بدن و مهار ترشح IL-6 و اثرات مثبت بر سلامت روان و ارتقای کیفیت خواب می‌شود (۹ و ۱۳).

محدودیت‌ها و پیشنهادات: انجام مطالعات آتی به منظور درک مکانیسم‌های عمل در این حوزه تحقیقاتی و ارزیابی همزمان چندین نشانگر زیستی ضروری می‌باشد. علاوه بر این، پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با استفاده از مدل‌های پیشرفته حیوانی از جمله موش‌های کلونیزه شده با میکروبیوتای انسانی مورد آزمایش قرار گیرد. در نهایت، انجام این چنین مطالعات مقدماتی می‌تواند پایه‌ای برای طراحی کارآزمایی‌های مقایسه‌ای قطعی‌تر در آینده را به

نتیجه گیری

سویه‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدیوباکتریوم لانگوم از طریق محور روده-مغز به کاهش علائم بی‌خوابی و بهبود کیفیت خواب کمک می‌کنند. اثرات بیولوژیکی به وسیله چند سازوکار اصلی شامل تنظیم ریتم سیرکادینی، بیوسنتز نوروترانسمیتر گابا و تخفیف التهاب عصبی با استفاده از SCFAها و نهایتاً تعدیل پاسخ ایمنی از طریق کاهش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی صورت می‌پذیرد. با این وجود، موانع اساسی در این زمینه نظیر پیچیدگی ارتباط بین سیستم میزبان و میکروبیوم، ناهمگونی پروتکل‌های مطالعاتی و خلأ بیومارکرهای زیستی برای بررسی پاسخ‌های درمانی آینده مورد نظر است. توانایی خاص این سویه‌ها در انعطاف‌پذیری و سیگنال‌دهی روده-مغز سبب گسترش درمان‌های شخصی‌سازی شده و مکمل‌های مؤثر بر بی‌خوابی را امیدبخش می‌سازد. موفقیت در این مسیر مستلزم هم‌افزایی و همکاری تنگاتنگ متخصصان میکروبیولوژیست، نوروساینتیست‌ها و متخصصان خواب است تا این رویکرد طبق پروفایل میکروبیومی فرد طراحی شود. این مرور با تمرکز بر مکانیسم‌های دو سویه، قالبی برای پژوهش‌های آینده فراهم می‌کند.

سپاس گذاری

این مقاله مروری با حمایت بی‌دریغ و راهنمایی‌های ارزشمند استاد محترم و نویسنده مسئول، سرکار خانم دکتر سهیلا افشاری آزاد، تکمیل شده است. اینجانب همچنین از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به دلیل فراهم‌آوری زیرساخت‌ها و منابع علمی لازم برای این پژوهش، صمیمانه سپاسگزارم.

منابع

- [1] Asaad NY, Ballan MW, Shalabi HYA, Hossain A. Gut Microbiome and Insomnia: A Mini-Review. *New Emirates Med J*. 2023;4(1):e221122211098.
- [2] Ji J, Jin W, Liu S-J, Jiao Z, Li X. Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease. *MedComm*. 2023;4:e420.
- [3] Martyka A, Kubicka-Figiel M, Taborska N, Ujma P. The Sleep Microbiome: Insights into Probiotics and Sleep Health. *J Educ Health Sport*. 2024;57:26-39.
- [4] Li C, Chen S, Wang Y, Su Q. Microbiome-Based Therapeutics for Insomnia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(24):13208.
- [5] Dogan NM, Kart NNB. Insomnia and Gut Microbiota. *Journal of Turkish Sleep Medicine*. 2024;11:1-9.
- [6] dos Santos A, Galis S. The Microbiota–Gut–Brain Axis in Metabolic Syndrome and Sleep Disorders: A Systematic Review. *Nutrients*. 2024;16(3):390.
- [7] Mudaliar SB, Poojary SS, Prasad ASB, Mazumder N. Probiotics and Paraprobiotics: Effects on Microbiota-Gut-Brain Axis and Their Consequent Potential in Neuropsychiatric Therapy. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2024;16(4):1440-1464.
- [8] You M, Chen N, Yang Y, Cheng L, He H, Cai Y, Liu Y, Liu H, Hong G. The gut microbiota–brain axis in neurological disorders. *MedComm*. 2024;5:e656.
- [9] Wagner-Skacel J, Dalkner N, Moerkl S, Kreuzer K, Farzi A, Lackner S, Painold A, Reininghaus EZ, Butler MI, Bengesser S. Sleep and Microbiome in Psychiatric Diseases. *Nutrients*. 2020; 12(8): 2198.
- [10] Chan HHY, Siu PLK, Choy CT, Chan UK, Zhou J, Wong CH, et al. Novel Multi-Strain E3 Probiotic Formulation Improved Mental Health Symptoms and Sleep Quality in Hong Kong Chinese. *Nutrients*. 2023;15(24):5037.
- [11] De Oliveira FL, Salgado MK, de Oliveira MT, Mesa V, Sartoratto A, Peregrino AM, Ramos WS, Sivieri K. Exploring the Potential of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 as Promising Psychobiotics Using SHIME. *Nutrients*. 2023;15(6):1521.
- [12] Wiącek J, Podgórski T, Kusy K, Loniewski I, Skonieczna-Żydecka K, Karolkiewicz J. Evaluating the Impact of Probiotic Therapy on the Endocannabinoid System, Pain, Sleep and Fatigue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Dancers. *Int J Mol Sci*. 2024;25(11):5611.
- [13] Lee HJ, Hong JK, Kim JK, Kim DH, Jang SW, Han SW, Yoon IY. Effects of Probiotic NVP-1704 on Mental Health and Sleep in Healthy Adults: An 8-Week Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*. 2021; 13(8): 2660.
- [14] Carlman HMTE, Rode J, König J, Reipsilber D, Hutchinson AN, Thunberg P, Persson J, Kiselev A, Pruessner JC, Brummer RJ. A Probiotic Mixture Containing *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum* and *Lactiplantibacillus plantarum* Affects Brain Responses to an Arithmetic Stress Task in Healthy Subjects: A Randomised Clinical Trial and Proof-of-Concept Study. *Nutrients*. 2022;14(7):1329.
- [15] Lin A, Shih CT, Huang CL, Wu CC, Lin CT, Tsai YC. Hypnotic Effects of *Lactobacillus*

fermentum PS150TM on Pentobarbital-Induced Sleep in Mice. *Nutrients*. 2019;11(10):2409.

[16] Patterson E, Tan HTT, Groeger D, Andrews M, Buckley M, Murphy EF, Groeger JA. *Bifidobacterium longum* 1714 improves sleep quality and aspects of well-being in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Sci Rep*. 2024;14:3725.

[17] Herrera-Rizquez D, Cabeza-Rodríguez R, Ballesteros-Yáñez I, Pérez-Gálvez B, Álvarez-Mercado AI, Rivas A, Ruiz de Adana JC, Olalla JM. Gut microbiota modulation and sleep: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *BMJ Nutr Prev Health*. 2023;6(1):122-135.

[18] Yu B, Wang KY, Wang NR, Zhang L, Zhang JP. Effect of probiotics and paraprobiotics on patients with sleep disorders and sub-healthy sleep conditions: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Neurol*. 2024;15:1477533.

[19] Asad A, Kirk M, Zhu S, Dong X, Gao M. Effects of Prebiotics and Probiotics on Symptoms of Depression and Anxiety in Clinically Diagnosed Samples: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutr Rev*. 2024;83(7):e1504-e1520.

[20] Pratiwi TR, Fibri DLN, Saputra WD. The Correlation between Probiotic Consumption and Sleep Quality among Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Gizi Pangan*. 2024;19(3):147-156.

[21] Le Morvan de Sequeira C, Hengstberger C, Enck P, Mack I. Effect of Probiotics on Psychiatric Symptoms and Central Nervous System Functions in Human Health and Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2022;14(3):621.

[22] Lin Z, Jiang T, Chen M, Ji X, Wang Y. Gut microbiota and sleep: Interaction mechanisms

and therapeutic prospects. *Open Life Sci*. 2024;19:20220910.

[23] Baranwal N, Yu PK, Siegel NS. Sleep physiology, pathophysiology, and sleep hygiene. *Prog Cardiovasc Dis*. 2023;77:59-69.

[24] Mosquera FEC, Lizcano Martinez S, Liscano Y. Effectiveness of Psychobiotics in the Treatment of Psychiatric and Cognitive Disorders: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Nutrients*. 2024;16(9):1352.

[25] Jurek JM, Castro-Marrero J. A Narrative Review on Gut Microbiome Disturbances and Microbial Preparations in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Implications for Long COVID. *Nutrients*. 2024;16(11):1545.

[26] Safarkar R, Alikhiavi P. A Review on the Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Probiotics in the Prevention and Improvement of Human Diseases. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*. 2022;30(12):6163-74.

[27] Dempsey E, Corr SC. *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front Immunol*. 2022;13:840245.

[28] Yang J, Su T, Zhang Y, Jia M, Yin X, Lang Y, Cui L. A bidirectional Mendelian randomization study investigating the causal role between gut microbiota and insomnia. *Front Neurol*. 2023;14:1277996.

[29] Al-Yami AM, Al-Mousa AT, Al-Otaibi SA, Khalifa AY. *Lactobacillus* Species as Probiotics: Isolation Sources and Health Benefits. *J Pure Appl Microbiol*. 2022;16(4):2270-2291.

[30] Jiang Z, Zhuo L, He Y, Fu Y, Shen L, Xu F, et al. The gut microbiota-bile acid axis links the positive association between chronic insomnia and cardiometabolic diseases. *Nat Commun*. 2022;13:3002.

