مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۳: از ۱-۱۰
پاییز ۱۳۸۹

بررسی کارایی و سمیت نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B در شرایط آزمایشگاهی

حسن‌محمد اصغری[1*]، امیر قریب[1]، زهره فائزی‌زاده[1و2]

۱- مربی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران
۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۳/۰۳ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۷/۲۰

چکیده

هدف: آمفوتریسین B یکی از قدیمی‌ترین داروهای ضد قارچی بوده و برای درمان عفونت‌های قارچی سیستمیک مناسب است. متأسفانه، این دارو برخی از آثار جانبی مانند سمیت در کلیه‌ها را از خود نشان می‌دهد. بنابراین اخیراً برای افزایش کارایی و کاهش سمیت آمفوتریسین B فرمولاسیون‌های جدیدی از آن تهیه می‌شود.

مواد و روش‌ها: نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B به روش جانشینی حلال با استفاده از پلیمرهایی نظیر پلی D و L- لاکتید- کو- گلیکولید تهیه و با استفاده از اکسید سیلیسیم به فرم پودر خشک تبدیل شد. کارایی محصورسازی آمفوتریسین B به روش اسپکتروفتومتری محاسبه شد. همچنین مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی نانوکپسول‌های تهیه شده برای قارچ کاندیدا آلبیکانس (ATCC 90028) با استفاده از روش رقت‌سازی متوالی اندازه‌گیری شد. سپس آثار سمی آن بر گلبول‌های قرمز انسانی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که کارایی محصورسازی آمفوتریسین B معادل ۰/۱۳ ± ۷۵ درصد است. مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B بر ضد قارچ کاندیدا آلبیکانس مورد مطالعه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک مذکور به فرم آزاد کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. همچنین اثر سمی آمفوتریسین B محصور در نانوکپسول‌ها بر گلبول‌های قرمز انسانی ۵/۸۹ بار کمتر از فرم آزاد این دارو بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها بیانگر این است که نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B تهیه شده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک سیستم ناقل مناسب برای این دارو در درمان عفونت‌های قارچی به‌کار گرفته شود.

کلیدواژگان: آمفوتریسین B، نانوکپسول، کاندیدا آلبیکانس، کارایی محصورسازی

۱- مقدمه

آمفوتریسین B (Amphotericin B) مؤثرترین دارو مورد استفاده برای درمان عفونت‌های ناشی از قارچ‌های سیستمیک است. این آنتی‌بیوتیک با اتصال به ارگوسترول (Ergosterol) موجود در غشای سلول قارچ‌ها باعث ایجاد منافذ در آن شده و در نهایت باعث تخریب غشای سلول‌های قارچ و مرگ آن می‌شود [۱]. همچنین این آنتی‌بیوتیک قادر است به کلسترول موجود در غشای سلول‌های پستانداران متصل و آثار سویی ایجاد نماید. دفع این آنتی‌بیوتیک توسط کلیه‌ها باعث تخریب این اندام می‌شود. این سمیت در درمان عفونت قارچ‌های سیستمیک که نیاز به دارو درمانی طولانی دارد، تشدید می‌شود؛

*نشانی مکاتبه: بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، کدپستی: ۶۹۱۵۱۳۶۱۱۱
Email: Asgharimh3214@yahoo.com

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

زیرا در این حالت نیاز است که دارو با غلظت زیاد به‌مدت طولانی در بدن موجود باشد [۲]. یکی از روش‌های جدید دارو درمانی استفاده از حمل دارو با استفاده ازمواد پلیمری مانند نانوذرات (Nanoparticle) است که حامل‌ها از جنس پلیمر و اندازه آن‌ها در حد نانومتر است. نانوذرات شامل سه دسته از حاملین دارویی به‌نام نانوکپسول‌ها و نانوسفرها (Nanospheres) و میسل‌های مخلوط (Mixed Micelles) است [۳]. حاملین می‌توانند دارو را در خود محصور نموده و از این طریق از سمیت آن در بدن بکاهند، در ضمن این حاملین دارویی باعث می‌شوند که نیمه عمر دارو در بدن بیشتر و از این طریق دوز کمتری از دارو برای درمان نیاز باشد که خود به کمتر شدن اثر جانبی دارو و آثار تخریبی آن روی بافت‌های مختلف منجر خواهد شد [٤]. برای تهیه نانوذرات از پلیمرهایی مانند پلی‌کاپرولاکتون (Polycaprolactone) و پلی‌لاکتید- کو- گلیکولید (Polylactide co Glycolide) استفاده می‌شود [٥]. روش‌های مختلفی برای تهیه نانوکپسول‌ها وجود دارد که می‌توان به روش‌های جانشینی حلال و تبخیر حلال اشاره نمود [٦]. به‌طور معمول پس از تهیه، مواد محصور نشده را با اولتراسانتریفوژ از نانوکپسول‌ها جدا می‌نمایند و سپس آن‌ها را با اولترافیلتراسیون از نظر قطر ذره‌ای یک‌دست می‌کنند. همچنین برای اندازه‌گیری غلظت داروی محصور شده از روش‌هایی مانند کروماتوگرافی و نیز اسپکتروفتومتری استفاده می‌نمایند [۷]. برای تهیه پودر خشک نانوکپسول‌ها از موادی استفاده می‌شود که حالت کلوئیدی ایجاد نماید. از جمله این مواد می‌توان به ماده کلوئیدی سیلیکون دی‌اکساید (Silicon Dioxide) اشاره نمود [۸]. با توجه به این‌که تحقیقات گسترده‌ای در دنیا برای تهیه فرمولاسیون های (Formulations) کم ضررتر این آنتی‌بیوتیک در حال انجام است، در این پروژه به تهیه نانوکپسول‌های این دارو با فرمولاسیونی جدید پرداخته شد و سپس کارایی آن در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

برخی از مواد به‌کار گرفته شده در این تحقیق شامل پلی‌D و L- لاکتید- کو- گلیکولید، پلی‌کاپرولاکتون، آمفوتریسین B از شرکت Sigma و آئروسیل ۲۰۰ (Aerosil 200) از شرکت Merck خریداری شد.

۲-۲- دستگاه‌های مورد استفاده

در این تحقیق از دستگاه‌های مختلفی نظیر روتاری اواپوراتور (Rotary Evaporator) ساخت شرکت Heidolph مدل ZQF-85، پمپ خلاء ساخت شرکت Emerson مدل 0205، اسپکتروفتومتر مرئی- ماوراء بنفش ساخت شرکت Shimadzu مدل 2200، دستگاه اولترافیلتراسیون ساخت شرکت Millipore مدل G-200، دستگاه زتا سایزر (Zeta Sizer) ساخت شرکت Malvern مدل 3000HAS و pH متر ساخت شرکت Mettler-Toledo مدل 320 استفاده شد.

۲-۳- تهیه نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B به شکل پودر خشک

در این تحقیق با استفاده از روش جانشینی حلال نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B با فرمولاسیونی جدید تهیه و به شکل پودر خشک تبدیل شد [۹، ۱۰]. ابتدا یک گرم از مواد پلی‌D و L- لاکتید، پلی‌کاپرولاکتون و پلی D و L- لاکتید- کو- گلیکولید داخل یک ظرف ریخته شد، سپس به آن ۱۵۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B افزوده شد. در مرحله بعد ۷٦٦ میلی‌گرم سوربیتان مونواستئارات (Sorbitan Monostearate) و ۳/۳ میلی‌لیتر روغن معدنی به آن افزوده شد. به مخلوط فوق ۲۷۰ میلی‌لیتر استن اضافه و سپس با دستگاه همزن برقی مخلوطی همگن ایجاد شد. برای حلالیت بهتر آمفوتریسین B در محلول فوق، با استفاده از pH

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

متر و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال، pH محلول روی ۳ تنظیم شد. سپس محلول حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد به بخش آلی فوق همراه با عمل هم زدن، ۵۳۰ میلی‌لیتر محلول آبی حاوی ۷٦٦ میلی‌گرم ماده پلوکسامر 188 (Poloxamer 188) اضافه شد. در نهایت با استفاده از دستگاه روتاری اواپوراتور استن و آب موجود در محلول تحت شرایط خلاء و فشار کم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد تا حجم آن به ۱۰ میلی‌لیتر برسد. سپس حجم محلول باقی مانده با آب مقطر دیونیزه به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و بدین صورت ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون حاوی نانوکپسول‌های آمفوتریسین B تهیه شد. برای جداسازی نانوکپسول‌ها از ترکیبات آزاد و محصور نشده محلول سوسپانسیون به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ شد. بدین صورت نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B رسوب نموده و جداسازی شد. سپس رسوب مذکور در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه حل و با استفاده از فیلتر پلی‌کربنات با قطر ۲۵۰ نانومتر توسط دستگاه اولترافیلتراسیون Millipore اولترافیلتره و بدین صورت نانوکپسول‌های تهیه شده از نظر قطر ذره‌ای یکنواخت شد. سپس به محلول به‌دست آمده همراه با عمل هم‌زدن و حرارت دادن، ۵ گرم از پودر ماده آئروسیل ۲۰۰ اضافه شد تا محلول مذکور حالت نیمه خشک به‌خود گرفت. در مرحله بعد محلول نیمه خشک ایجاد شده به دستگاه روتاری اواپوراتور منتقل شد و تحت شرایط خلاء و فشار کم به‌طور کامل آب‌گیری و پودر خشک نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B تهیه شد. سپس پودر خشک تهیه شده به دقت وزن و برای مراحل بعدی تحقیقات استفاده شد. در این تحقیق برای تهیه نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B به‌صورت پودرخشک برای مقایسه با نانوکپسول‌های حاوی این آنتی‌بیوتیک همانند روش‌های گفته شده در بالا عمل شد؛ با این تفاوت که از اضافه نمودن آمفوتریسین B به فرمولاسیون صرف نظر شد.

۲-٤- اندازه‌گیری مقدار آمفوتریسین B محصور شده در یک گرم از نانوکپسول‌های تهیه شده به فرم پودرخشک

اندازه‌گیری مقدار آمفوتریسین B موجود در یک گرم از پودر خشک نانوکپسول‌های تهیه شده به‌وسیله روش تیابوناچی (Tiyaboonachai) و کلمونس (Clemons) با استفاده از رسم نمودار استاندارد انجام شد [۱، ۷]. ابتدا ٤/۸ میلی‌گرم آمفوتریسین B خالص در یک میلی‌لیتر محلول متانول آب (به نسبت حجمی ۱ به ۱) حل شد و سپس با استفاده از متانول از آن رقت‌های ۱ به ۲، ۱ به ٤، ۱ به ۸، ۱ به ۱٦ و ۱ به ۳۲ تهیه شد. بعد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۰۸ نانومتر جذب محلول‌های فوق در مقابل متانول خالص قرائت شد. در نهایت با استفاده از جذب‌های قرائت شده و غلظت آمفوتریسین B در هر لوله نمودار استاندارد تغییرات جذبی آمفوتریسین B در برابر تغییرات غلظت آن رسم شد. در مرحله بعد ۲۰ میلی‌گرم از پودر خشک نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B وزن شده و در یک میلی‌لیتر محلول متانول- آب (به نسبت حجمی ۱ به ۱) حل شد. با این عمل غشای خارجی نانوکپسول‌های تهیه شده از بین رفته و آمفوتریسین B موجود در آن‌ها رها شد. سپس محلول فوق برای ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی ایجاد شده با ۰/۹۸ میلی‌لیتر محلول متانول- آب (به نسبت حجمی ۱ به ۱) رقیق و جذب آن در طول موج ٤۰۸ نانومتر در مقابل محلول متانول خالص تعیین شد. در نهایت عدد به‌دست آمده به نمودار استاندارد منتقل و بدین صورت مقدار آنتی‌بیوتیک محصور در ۲۰ میلی‌گرم پودر خشک نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B تعیین شد. سپس با استفاده از آن، مقدار آمفوتریسین B محصور در یک گرم پودر خشک محاسبه شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۲-۵- اندازه‌گیری مقدار کارایی محصورسازی نانوکپسول‌های آمفوتریسین B

برای اندازه‌گیری مقدار کارایی محصورسازی روش به‌کار رفته در تهیه نانوکپسول‌ها از روش تیابوناچی و آمارال (Amaral) استفاده شد [۱، ۱۰]. در این روش با استفاده از معادله زیر درصد کارایی محصورسازی محاسبه شد:

$$\text{درصد کارایی محصورسازی} = \frac{\text{مقدار آمفوتریسین B محصور شده در یک گرم نانوکپسول به فرم پودر خشک}}{\text{مقدار آمفوتریسین B مصرفی اولیه برای تهیه یک گرم نانوکپسول به فرم پودر خشک}} \times ۱۰۰$$

همچنین برای اندازه‌گیری قطر ذرات نانوکپسول‌های تهیه شده و اثبات تشکیل ذرات نانوکپسولی از روش تیابوناچی استفاده شد [۱]، بدین صورت که ابتدا ۲۵ میلی‌گرم پودر خشک نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شد و سپس قطر ذرات نانوکپسولی موجود در این محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با زاویه تفرق ۹۰ درجه با دستگاه زتاسایزر اندازه‌گیری شد.

۲-٦- مطالعه و مقایسه آثار سمی نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B و نانوکپسول‌های فاقد آن با فرم آزاد دارو بر گلبول‌های قرمز در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی آثار سمی نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و فرم آزاد آن بر گلبول‌های قرمز در شرایط آزمایشگاهی از روش چاکرابورتی (Chakraborty) و همکارانش استفاده شد [۱۱]. در این روش ۵ میلی‌لیتر نمونه خون سیاهرگی انسان در ظرف نمونه حاوی ۲۵۰ واحد هپارین جمع‌آوری و سپس با دور ٤۵۰۰ برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و پلاسمای آن دور ریخته شد. سپس به گلبول‌های قرمز جمع‌آوری شده، ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS) (۰/۱۵ مولار با pH معادل ۷/٤) اضافه شد و مجدداً عمل سانتریفوژ تکرار شد. این عمل ۲ بار دیگر تکرار شد و بدین صورت سوسپانسیون گلبول‌های قرمز شسته شده تهیه شد. در مرحله دیگر به ۲۵۱ لوله آزمایش مقادیر ۰ تا ۲۵۰ میکروگرم آمفوتریسین B وارد شد و به هر لوله یک میلی‌لیتر محلول PBS (۰/۱۵ مولار با pH معادل ۷/٤) اضافه شد و بدین صورت لوله‌های حاوی غلظت‌های ۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آمفوتریسین B تهیه شد. همین عمل برای نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B به فرم پودر خشک نیز انجام شد؛ یعنی این بار نیز در ۲۵۱ لوله آزمایش به‌ترتیب پودر خشک نانوکپسول‌های حاوی ۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم آمفوتریسین B ریخته شد و یک میلی‌لیتر PBS (۰/۱۵ مولار با pH معادل ۷/٤) به هر لوله اضافه شد. به این صورت غلظت آمفوتریسین B در ۲۵۱ لوله به‌ترتیب به ۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رسید. در مورد تهیه غلظت‌های مختلف حاوی نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B نیز دقیقاً مانند بالا عمل شد؛ بدین صورت که به ۲۵۱ لوله حاوی یک میلی‌لیتر PBS ۰ تا ۲۵۰ میکروگرم پودر خشک نانوکپسول فاقد آمفوتریسین B اضافه شد. سپس از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز شسته شده در بالا با استفاده از PBS (۰/۱۵ مولار با pH معادل ۷/٤) محلول ۰/۱ درصد تهیه شد و ۰/۸ میلی‌لیتر از آن به لوله‌های حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده در بالا اضافه شد. لوله‌های مذکور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای یک ساعت انکوبه شد و سپس برای ۲ دقیقه در دور ۱۰۰۰×g سانتریفوژ انجام شد. بدین صورت در محلول رویی هموگلوبین و اجزای گلبول‌های قرمز لیز شده قرار گرفت و گلبول‌های قرمز لیز نشده نیز رسوب کرد. سپس محلول رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد به رسوب ایجاد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

شده یک میلی‌لیتر محلول ۰/۳ درصد تریتون X۱۰۰ اضافه شد. در این حالت گلبول‌های قرمز لیز شد و هموگلوبین موجود در آن‌ها رها شد. سپس مقدار هموگلوبین آزاد شده در محلول اندازه‌گیری شد.

در یک لوله آزمایش دیگر به‌عنوان شاهد، ۰/۸ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون یک درصد گلبول‌های قرمز ریخته شد و به آن ۰/۲ میلی‌لیتر PBS (۰/۱۵ مولار با pH معادل ۷/٤) و یک میلی‌لیتر محلول ۰/۳ درصد تریتون X۱۰۰ اضافه شد، در این حالت تمام گلبول‌های قرمز لیز و هموگلوبین موجود در آن‌ها آزاد شد. مقدار هموگلوبین در این محلول اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از معادله زیر درصد لیز گلبول‌های قرمز در هر لوله محاسبه شد.

$$\text{درصد لیز} = \frac{\text{مقدار هموگلوبین موجود در محلول رویی لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و نیز آمفوتریسین B به فرم آزاد}}{\text{مقدار هموگلوبین موجود در لوله شاهد}} \times ۱۰۰$$

در مرحله بعد نمودار تغییرات درصد لیز گلبول‌های قرمز در مقابل غلظت آمفوتریسین B به فرم آزاد و نیز غلظت آمفوتریسین B محصور در نانوکپسول‌ها و همچنین غلظت نانوکپسول‌های فاقد این دارو رسم شد.

۲-۷- اندازه‌گیری حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) برای محلول نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و آنتی‌بیوتیک به فرم آزاد

برای انجام این بخش از روش رقت‌سازی متوالی استفاده شد. این روش یکی از دقیق‌ترین روش‌هایی است که برای تعیین حساسیت قارچ‌ها نسبت به مواد ضد قارچی مورد استفاده قرار می‌شود [۱۲]. در این روش ابتدا ۱۰ لوله حاوی یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل برای هر سری آزمایش آماده شد. به اولین لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی نانوکپسول‌های آمفوتریسین B (با غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه شد. سپس بعد از مخلوط نمودن محتویات آن، ۱ میلی‌لیتر از آن برداشته شد و به لوله دوم حاوی ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد. همین عمل تا لوله دهم ادامه پیدا کرد و در نهایت ۱ میلی‌لیتر از لوله دهم برداشته و دور ریخته شد و بدین صورت یک ردیف رقت در هر ۱۰ لوله تهیه شد که غلظت آمفوتریسین B (به فرم محصور در نانوکپسول) در آن‌ها به‌ترتیب ۸، ٤، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰٦۲، ۰/۰۳۱ و ۰/۰۱۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سوش استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکانس (*Candida albicans*) (ATCC 90028) نیز که کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند برابر بود، آماده شد. به هرکدام از لوله‌های فوق ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی تهیه شده اضافه شد و به‌مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس از هرکدام از لوله‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت حاوی محیط سابرودکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) منتقل شد و به‌مدت ۲٤ ساعت پلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در یک محیط کشت و محیط‌های بعد از آن رشدی از قارچ مذکور مشاهده نشد. غلظت آمفوتریسین B موجود در لوله‌ای که این محیط کشت از آن تولید شده بود، برابر با MIC محلول نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B بود. برای تعیین MIC محلول آمفوتریسین B به فرم آزاد و نیز نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B همانند روش ذکر شده در بالا عمل شد.

۲-۸- بررسی و مقایسه اثر نانوکپسول‌ها حاوی و فاقد آمفوتریسین B و نیز فرم آزاد آن در غلظت برابر MIC به‌صورت آزمایشگاهی

در این قسمت از پروژه از روش دلوگو (Delogu)، جانگ (Jung) و همکارانشان که به‌ترتیب در سال ۲۰۰۰ و ۲۰۰۹

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

میلادی به‌کار گرفته شده، استفاده شد [۱۳، ۱٤]. در این روش آثار ضد قارچی نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B و فرم آزاد آن با بررسی تعداد کلونی تشکیل شده از هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع باکتری در غلظت برابر MIC مطالعه شد. بدین صورت که ابتدا قارچ کاندیدا آلبیکانس روی محیط کشت کازیتون براث (Casitone Broth) کشت داده شد. پس از رسیدن درجه کدورت آن به نیم مک فارلند [5×10^3 CFU (Colony Forming Unit) در هر میلی‌لیتر] ۱۰ میکرولیتر از آن برداشته شد و به یک لوله محیط کشت کازیتون براث حاوی یک میلی‌لیتر محلول نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B که مقدار آنتی‌بیوتیک محصور در آن برابر با MIC محلول نانوکپسول‌های مذکور بود، اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس در مدت زمان‌های ۰، ۲، ٤، ٦ و ۲٤ ساعت از محیط کشت مذکور به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت جامد سابرودکستروز آگار منتقل شد. عمل انکوباسیون برای مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور انجام شد. بعد از آن تعداد کلونی‌های تشکیل شده در محیط کشت جامد شمارش شد. در نهایت تعداد کلونی‌های تشکیل شده برای یک میلی‌لیتر محیط کشت مایع محاسبه شد. سپس تغییرات لگاریتمی تعداد کلونی‌های تشکیل شده در زمان‌های ۰، ۲، ٤، ٦ و ۲٤ ساعت با رسم نمودار مرگ- زمان (Time-Kill Curve) مشخص شد. این آزمایش در مورد محلول نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B و نیز آنتی‌بیوتیک مذکور به فرم‌آزاد در غلظت‌های برابر MIC تکرار شد.

۲-۹- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این تحقیق نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار (Mean±SD) گزارش شد. همچنین با استفاده از آزمون t-test و آنوای (ANOVA) دو طرفه داده‌های به‌دست آمده مقایسه شد. در این تحقیق $P<0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار کارایی محصورسازی نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B

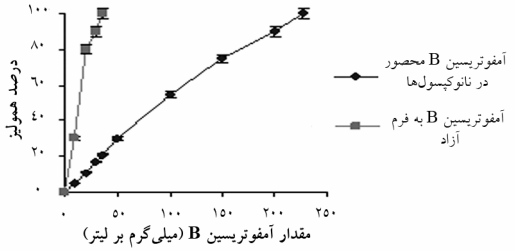
با استفاده از معادله ذکر شده در روش کار و نیز با توجه به مقدار آمفوتریسین B محصور شده در یک گرم پودر خشک نانوکپسول‌های تهیه شده (۱۱/٤۸±۰/۳۱ میلی‌گرم)، کارایی محصورسازی روش جانشینی حلال برای تهیه یک میلی‌گرم از پودرخشک نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B معادل ۷۵±۰/۳۱ درصد تعیین شد. همچنین با توجه به روش به‌کار گرفته شده میانگین قطر ذرات نانوکپسولی تهیه شده معادل ۱٤۳±۲/۳ نانومتر تعیین شد.

۳-۲- نتایج حاصل از بررسی آثار سمی نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و فرم آزاد آن بر گلبول‌های قرمز شرایط آزمایشگاهی

نتایج این بخش از تحقیقات که به روش چاکرابورتی و همکارانش انجام شد، در نمودار ۱ مشاهده می‌شود. شکل آزاد آمفوتریسین B و نیز فرم محصور در نانوکپسول آن با افزایش غلظت باعث همولیز تعداد بیشتری از گلبول‌های قرمز شد، اما با این حال اختلاف درصد همولیز بین این دو به نحو چشمگیری معنی‌دار بود ($P<0/05$). مثلاً نانوکپسول‌های حاوی ۳۸ میلی‌گرم بر لیتر آمفوتریسین B، فقط ۱۵±۰/۱٤ درصد گلبول‌های قرمز محیط آزمایش را همولیز نمود؛ در حالی‌که در این غلظت (۳۸ میلی‌گرم بر لیتر) آمفوتریسین B به فرم آزاد، تقریباً ۱۰۰ درصد گلبول‌های قرمز مورد آزمایش را همولیز کرد. حداکثر همولیز (۱۰۰ درصد) گلبول‌های قرمز در مورد نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B در غلظت ۲۲٦ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده می‌شود که ۵/۸۹ برابر غلظت آمفوتریسین B به

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

فرم آزاد است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوکپسول‌های تهیه شده ۵/۸۹ بار سمیت آمفوتریسین B را در مقایسه با فرم آزاد آن روی گلبول‌های قرمز (به‌عنوان شاخص سلول‌های خون و بدن) کاهش می‌دهد. در ضمن لازم به ذکر است که نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B اثری بر لیز گلبول‌های قرمز نداشت که می‌تواند شاخص مناسبی برای بیان عدم سمیت پلیمرهای به‌کار گرفته شده در تهیه نانوکپسول‌ها بر سلول‌های انسانی باشد.



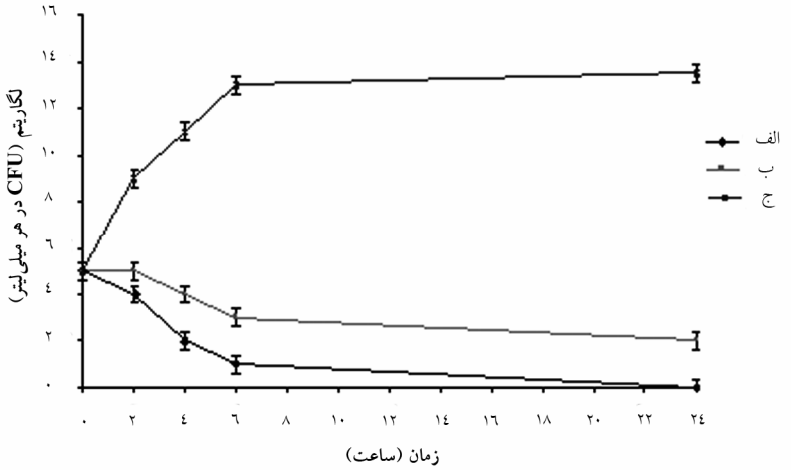
نمودار ۱ تغییرات درصد لیز گلبول‌های قرمز در برابر غلظت آمفوتریسین B (آزمایش‌ها ۱۰ بار تکرار شده و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند)

جدول ۱ مقدار MIC رشد آمفوتریسین B به فرم آزاد و محصور در نانوکپسول‌ها

MIC رشد (میلی‌گرم بر لیتر)	
آمفوتریسین B به فرم آزاد	آمفوتریسین B محصور در نانوکپسول‌ها
۰/۵۰	۰/۲۵

۳-۳- نتایج بررسی اندازه‌گیری MIC رشد قارچ برای نانوکپسول‌های تهیه شده حاوی آمفوتریسین B و فرم آزاد آن

MIC رشد قارچ کاندیدا آلبیکانس (ATCC 90028) برای نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B و فرم آزاد این آنتی‌بیوتیک در جدول ۱ مشاهده می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقدار MIC آمفوتریسین B برای حالت محصور در نانوکپسول‌ها نصف مقدار آن در فرم آزاد است. بررسی اثر نانوکپسول‌های فاقد آنتی‌بیوتیک روی رشد قارچ کاندیدا آلبیکانس مذکور نشان داد که این نانوکپسول‌ها تأثیری در رشد قارچ مذکور نداشته یعنی تعداد کلونی‌های قارچی تشکیل شده در حضور یا عدم حضور این نوع نانوکپسول‌ها برابر است.



نمودار ۲ تغییرات لگاریتمی تعداد کلونی‌های تشکیل شده در غلظت‌های برابر MIC نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و آنتی‌بیوتیک مذکور به فرم آزاد؛ الف) نمودار مربوط به نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B، ب) نمودار مربوط به آمفوتریسین B به فرم‌آزاد، ج) نمودار مربوط به نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B (قابل ذکر است که هر آزمایش ۱۰ بار تکرار شده است)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۳-٤- نتایج مقایسه اثر نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و فرم آزاد آن در غلظت برابر MIC در شرایط آزمایشگاهی

نمودار ۲ نشان دهندهٔ تغییرات لگاریتمی تعداد کلونی‌های تشکیل شده در غلظت‌های برابر MIC فرم آزاد آمفوتریسین B و نانوکپسول‌های حاوی و فاقد این آنتی‌بیوتیک است. همان‌طور که مشاهده می‌شود نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B در مدت زمان ٢٤ ساعت توانسته است رشد قارچ مذکور را متوقف نماید؛ در حالی‌که فرم آزاد آن قادر به این عمل نبوده و اختلاف بین لگاریتم تعداد کلونی‌های تشکیل شده معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

٤- بحث

امروزه تحقیقات در زمینه تولید حاملین داروی آمفوتریسین B در راستای تولید دسته‌ای از حاملین ویژه است که سمیت این دارو را بدون این‌که تأثیری بر خاصیت ضد قارچی آن داشته باشد، در بدن انسان به حداقل برسانند [۱۰]. به چند دلیل تولید نانوذرات حاوی این دارو مورد توجه قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به مواردی نظیر بهای کمتر پلیمرهای مصرفی و سمیت کمتر نانوذرات تهیه شده نسبت به سایر حاملین دارویی [۱۵، ١٦] اشاره کرد. مشخص شده است که سمیت داروی آمفوتریسین B بر سلول‌های پستانداران از طریق افزایش تشکیل منافذ موجود در غشا به‌علت اتصال آن به کلسترول موجود در غشای سلول‌ها است [۱۷]. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نانوکپسول‌های تهیه شده حاوی آمفوتریسین B به‌مقدار چشمگیری از اثر همولیزی این دارو بر گلبول‌های قرمز (به‌عنوان نماینده سلول‌های بدن انسان) در مقایسه با فرم آزاد آمفوتریسین B جلوگیری می‌نماید. این نتیجه منطبق بر مشاهده جانگ و همکارانش است که گزارش نمودند یک نوع نانوذرات حامل آمفوتریسین B به‌نام LNP-AmB در مقایسه با آمفوتریسین B به فرم آزاد سمیت کمتری بر گلبول‌های قرمز و سلول‌های کلیوی انسان دارد [١٤]. مطالعه ضد قارچی نانوکپسول‌های تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که بسته‌بندی آمفوتریسین B در این فرمولاسیون نه تنها اثر ضد قارچی داروی مذکور را کم نمی‌کند بلکه اثر آن را نیز تقویت می‌نماید. این امر طبق نتایج به‌دست آمده از سایر تحقیقات می‌تواند ناشی از عواملی مانند افزایش غلظت آمفوتریسین B در اطراف سلول‌های قارچی و نیز افزایش ورود آمفوتریسین B به این سلول‌ها باشد که هر دو مورد ذکر شده از محصور شدن دارو در لایه پلیمری منشأ گرفته است [۱۰، ۱۸]. کاهش MIC نانوکپسول‌های تهیه شده در مقایسه با آمفوتریسین B به فرم آزاد همان‌طور که لمکه (Lemke) و تاکموتو (Takemoto) در مورد نانوذرات حاوی آمفوتریسین B گزارش نموده‌اند [۱۹، ۲۰]، می‌تواند گویای این باشد که نانوکپسول‌های تهیه شده به علت سمیت کمتر نسبت به فرم آزاد دارو می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای درمان عفونت‌های قارچی نظیر عفونت‌های ناشی از قارچ کاندیدا آلبیکانس استفاده شود. در این تحقیق آثار ضد قارچی نانوکپسول‌های تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی روی سوش استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکانس نشان از کارایی بالای آن در مقایسه با فرم آزاد دارو داشت؛ زیرا دوز کمتر نانوکپسول‌های تهیه شده (در مقایسه با فرم آزاد آمفوتریسین B) رشد قارچ مذکور را متوقف نمود. محققی به نام اتسوبو (Otsubo) و همکارانش گزارش نمودند که نانوذرات تهیه شده حاوی آمفوتریسین B به‌نام NS-718 در شرایط آزمایشگاهی کارایی بیشتری نسبت به فرم آزاد داروی مذکور در از بین بردن قارچ کریپتوکوکوس نئوفورمانس (*Cryptococcus neoformans*) دارد [۲۱]. در نهایت مطالعه انجام شده نشان داد که نانوکپسول‌های تهیه شده می‌تواند به‌عنوان یک فرمولاسیون مناسب داروی آمفوتریسین B برای درمان بیماران قارچی مورد استفاده قرار گیرد، زیرا یک تعادل مناسب بین سمیت و کارایی ضد قارچی آن وجود دارد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۵- تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام شده است که بدین‌وسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

٦- منابع

[1] Tiyaboonchai W, Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. Int J Pharm 2007; 329(1-2): 142–9.

[2] Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68(2): 151–62.

[3] Esmaeili F, Hosseini-Nasr M, Rad-Malekshahi M, Samadi N, Atyabi F, Dinarvand R. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. Nanomedicine 2007; 3(2): 161–7.

[4] Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. J Control Release 2008; 125(3): 193–209.

[5] Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. Pharm Res 2006; 23(7): 1417–50.

[6] Khandare J, Minko T. Polymer–drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. Prog Polym Sci 2006; 31(4): 359–97.

[7] Clemons KV, Stevens DA. Comparative efficacies of four amphotericin B formulations-Fungizone, amphotec (Amphocil), AmBisome, and Abelcet against systemic murine aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(3): 1047–50.

[8] Alexander BD, Wingard JR. Study of renal safety in amphotericin B lipid complex-treated patients. Clin Infect Dis 2005; 40 Suppl 6: S414–21.

[9] Raffin Pohlmann A, Weiss V, Mertins O, Pesce da Silveira N, Staniscuaski Guterres S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nano-capsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. Eur J Pharm Sci 2002; 16(4-5): 305-12.

[10] Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Nunes J, Peixoto DL, Simioni AR, Primo FL, Lacava ZG, Bentes R, Titze-de-Almeida R, Tedesco AC, Morais PC, Felipe MS. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. J Antimicrob Chemother 2009; 63(3): 529-33.

[11] Chakraborty KK, Naik SR. Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin - beta complexed with different chemically modified beta - cyclodextrins. J Pharm Pharm Sci 2003; 6(2): 231-7.

[12] Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex JH. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. J Clin Microbiol 1999; 37(12): 3946-51.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[13] De Logu A, Fadda AM, Pellerano ML, Diana G, Schivo ML. Prevention by L-alpha-phosphatidylcholine of antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated imidazoles determined by using time-killing curves. Int J Antimicrob Agents 2000; 15(1): 43-8.

[14] Jung SH, Lim DH, Jung SH, Lee JE, Jeong KS, Seong H, Shin BC. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. Eur J Pharm Sci 2009; 37(3-4): 313-20.

[15] Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP, Torrado JJ. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. Int J Pharm 2008; 361(1-2): 64–9.

[16] Fatouros DG, Bergenstahl B, Mullertz A. Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. Eur J Pharm Sci 2007; 31(2): 85-94.

[17] Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Prog Lipid Res 2003; 42(6): 463–78.

[18] Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM, Sarmento VH, Chiavacci LA, Scarpa MV, Egito ES, Oliveira AG. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. Colloids Surf B Biointerfaces 2008; 66(2): 253–9.

[19] Lemke A, Kiderlen AF, Petri B, Kayser O. Delivery of amphotericin B nanosuspensions to the brain and determination of activity against *Balamuthia mandrillaris* amebas. Nanomedicine 2010; 6(4): 597-603.

[20] Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y, Sumita Y, Yoshida K, Niki Y. Comparative study on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of pulmonary aspergillosis. J Antimicrob Chemother 2006; 57(4): 724-31.

[21] Otsubo T, Maesaki S, Hossain MA, Yamamoto Y, Tomono K, Tashiro T, Seki J, Tomii Y, Sonoke S, Kohno S. In vitro and in vivo activities of NS-718, a new lipid nanosphere incorporating amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(3): 471-5.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-03]