

## بررسی اثر ضد قارچی و سمیت نانوکپسول های پلی لاکتید-گلیکولید حاوی آمفوتریسین B به فرم پودر خشک در شرایط آزمایشگاهی

حسن محمد اصغری\*، امیر قریب، زهره فائزی زاده

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۱۰

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲

### چکیده

**مقدمه:** آمفوتریسین B یکی از قدیمی ترین داروهای ضد قارچی بوده و برای درمان عفونت های قارچی سیستمیک مناسب می باشد. متأسفانه، این دارو برخی اثرات جانبی نظیر سمیت بر روی کلیه ها را از خود نشان داده است. بنابراین، اخیراً جهت افزایش کارایی و کاهش سمیت آمفوتریسین B فرمولاسیون های جدیدی از آن تهیه می گردد.

**مواد و روش ها:** نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B به روش جانشینی حلال با استفاده از پلیمرهایی نظیر پلی D و L-لاکتید-کو-گلیکولید تهیه گردید. سپس نانوکپسول های مذکور با استفاده از اکسید سیلیسیم به فرم پودر خشک تبدیل شد و کارایی محصور سازی آمفوتریسین B به روش اسپکتروفتومتری مورد اندازه گیری قرار گرفت. از طرفی، مقدار حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) نانوکپسول های تهیه شده برای قارچ کاندیدا آلبیکانس (ATCC 90028) با استفاده از روش رقت سازی متوالی اندازه گیری شد. سپس اثرات سمی آن بر روی گلبول های قرمز انسانی در شرایط *in vitro* بررسی گردید.

**یافته های پژوهش:** نتایج نشان داد که کارایی محصورسازی آمفوتریسین B معادل  $75 \pm 0/13$  درصد است. مقدار MIC نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B بر ضد قارچ کاندیدا آلبیکانس مورد مطالعه در مقایسه با آنتی بیوتیک مذکور به فرم آزاد کاهش قابل ملاحظه ای نشان داد. علاوه بر این، اثر سمی آمفوتریسین B محصور در نانوکپسول ها بر روی گلبول های قرمز انسانی  $5/89$  بار کمتر از فرم آزاد این دارو بود.

**بحث و نتیجه گیری:** یافته ها بیانگر این است که نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B تهیه شده در این تحقیق می تواند به عنوان یک سیستم ناقل مناسب برای این دارو جهت درمان عفونت های قارچی به کار گرفته شود.

**واژه های کلیدی:** آمفوتریسین B، نانوکپسول، کاندیدا آلبیکانس، کارایی محصورسازی

\* نویسنده مسئول: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

## مقدمه

نمایند، از جمله این مواد می توان به ماده کلوتیدی سیلیکون دی اکساید اشاره نمود، (۸). با توجه به اینکه در دنیا تحقیقاتی بسیار گسترده برای تهیه فرمولاسیون های کم ضررتر این آنتی بیوتیک در حال انجام است، در این پروژه به تهیه نانوکپسول های این دارو با فرمولاسیونی جدید پرداخته شد و سپس کارایی آن در شرایط *in vitro* مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

این مطالعه به صورت تجربی در آزمایشگاه تحقیقات و میکروبیولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام گرفت.

## ۱/ مواد

برخی از مواد به کار گرفته شده در این تحقیق شامل پلی D و L- لاکتید- کو- گلیکولید، پلی کاپرولاکتون، آمفوتریسین B از شرکت سیگما و آژوسیل ۲۰۰ از شرکت مرک می گردد.

## ۲) روش تهیه نانوکپسول های حاوی و فاقد آمفوتریسین B به شکل پودر خشک

در این کار تحقیقی با استفاده از روش جانشینی، حلال نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B با فرمولاسیونی جدید تهیه و به شکل پودر خشک تبدیل گردید، (۹، ۱۰). ابتدا یک گرم از مواد پلی D و L- لاکتید، پلی کاپرولاکتون و پلی D و L- لاکتید- کو- گلیکولید درون یک بشر ریخته شد، سپس ۱۵۰ میلی گرم آنتی بیوتیک آمفوتریسین B به آن افزوده گردید. در مرحله بعد ۷۶۶ میلی گرم سوربیتان مونواسترات و ۳/۳ میلی لیتر روغن معدنی به آن اضافه شد. به مخلوط فوق ۲۷۰ میلی لیتر استن اضافه و سپس با دستگاه همزن برقی همزده شد تا مخلوطی همگن ایجاد گردد. برای حلالیت بهتر، آمفوتریسین B در محلول فوق با استفاده از pH متر (شرکت تولد و متلر، مدل ۳۲۰) و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، pH محلول بر روی ۳ تنظیم گردید. سپس محلول به دست آمده به مدت ده دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بعد به فاز آلی فوق همراه با عمل همزدن، ۵۳۰ میلی لیتر محلول آبی حاوی ۷۶۶ میلی گرم ماده پلوکسامر ۱۸۸ اضافه گردید. در نهایت، با استفاده از دستگاه روتاری اوپراتور (شرکت هایدولف، مدل

آمفوتریسین B موثرترین داروی مورد استفاده برای درمان عفونت های قارچی سیستمیک است. این آنتی بیوتیک با اتصال به آرگوسترول موجود در غشاء سلولی قارچ ها باعث ایجاد منافذ در آن شده و در نهایت سبب مرگ سلول می گردد، (۱). از طرفی، این آنتی بیوتیک قادر است به کلسترول موجود در غشاء سلول های پستانداران متصل شده و سبب ایجاد عوارض جانبی آن گردد. دفع این آنتی بیوتیک توسط کلیه ها باعث تخریب این اندام می شود. این سمیت در درمان عفونت قارچ های سیستمیک که نیاز به دارو درمانی طولانی دارند، تشدید می گردد، زیرا در این حالت نیاز است که دارو با غلظت زیاد به مدت طولانی در بدن باقی بماند، (۲). یکی از روش های جدید دارو درمانی استفاده از حامل دارو به کمک مواد پلیمری مانند نانو پارسیکل ها می باشد که حامل هایی از جنس پلیمرند و اندازه آن ها در حد نانومتر است. نانوپارسیکل ها شامل سه دسته از حاملین دارویی به نام نانوکپسول ها و نانوسفرها و میسل های مخلوط می باشند، (۳). این حاملین می توانند دارو را در خود محصور نموده و از این طریق از سمیت آن درون بدن بکاهند، در ضمن این حاملین دارویی باعث می گردند که نیمه عمر دارو در بدن بیشتر شود و از این طریق دوز کمتری از دارو برای درمان نیاز خواهد بود که خود به کمتر شدن اثر جانبی دارو و اثرات تخریبی آن روی بافت های مختلف می انجامد، (۴). جهت تهیه نانوپارسیکل ها از پلیمرهایی مانند پلی کاپرولاکتون و پلی لاکتید- کو- گلیکولید استفاده می شود، (۵). روش های مختلفی برای تهیه نانوکپسول ها وجود دارد که می توان به روش های جانشینی حلال و تبخیر حلال اشاره نمود، (۶). به طور معمول پس از تهیه مواد محصور نشده را با اولتراسونیکس از نانوکپسول ها جدا می نمایند و سپس آن ها را با اولترافیلتراسیون از نظر قطر ذره ای یکدست می کنند. هم چنین جهت اندازه گیری غلظت داروی محصور شده از روش هایی مانند کروماتوگرافی و نیز اسپکتروفتومتری استفاده می شود، (۷). جهت تهیه پودر خشک نانو کپسول ها از موادی استفاده می گردد که حالت کلوتیدی ایجاد

ابتدا ۴/۸ میلی گرم آمفوتریسین B خالص در یک میلی لیتر محلول متانول آب (به نسبت حجمی ۱ به ۱) حل شد و سپس با استفاده از متانول از آن رقت های ۱ به ۲، ۱ به ۴، ۱ به ۸، ۱ به ۱۶ و ۱ به ۳۲ تهیه گردید. بعد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت شیمیدزو مدل ۲۲۰۰) در طول موج ۴۰۸ نانومتر، جذب نوری محلول های فوق در مقابل متانول خالص قرائت شد. در نهایت با استفاده از جذب های قرائت شده و غلظت آمفوتریسین B در هر لوله، نمودار استاندارد تغییرات جذبی آمفوتریسین B در برابر تغییرات غلظت آن رسم گردید.

در مرحله بعد، ۲۰ میلی گرم از پودر خشک نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B وزن شده و در یک میلی لیتر محلول متانول-آب (به نسبت حجمی ۱ به ۱) حل گردید. با این عمل غشاء خارجی نانوکپسول های تهیه شده از بین رفته و آمفوتریسین B موجود در آن ها رها گردید. سپس محلول فوق برای ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ گردید. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی ایجاد شده با ۰/۹۸ میلی لیتر محلول متانول-آب (به نسبت حجمی ۱ به ۱) رقیق گردید و جذب نوری آن در طول موج ۴۰۸ نانومتر در مقابل محلول متانول خالص تعیین شد. در نهایت، عدد به دست آمده به نمودار استاندارد منتقل گردید و بدین صورت مقدار آنتی بیوتیک محصور در ۲۰ میلی گرم پودر خشک نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B تعیین شد. سپس با استفاده از آن مقدار آمفوتریسین B محصور در یک گرم پودر خشک محاسبه گردید.

۴) روش اندازه گیری مقدار کارایی محصورسازی نانوکپسول ها

برای اندازه گیری مقدار کارایی محصورسازی روش به کار رفته در تهیه نانوکپسول ها از روش Tiyaboonachai و Amaral به کار گرفته شد، (۱، ۱۰). در این روش با استفاده از معادله زیر درصد کارایی محصورسازی محاسبه گردید:

ZQF=۸۵ استن و آب موجود در محلول تحت شرایط خلاء و فشار کم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تبخیر شد، تا حجم آن به ۱۰ میلی لیتر رسید. سپس حجم محلول باقی مانده با آب مقطر دیونیزه به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و بدین صورت ۱۰۰ میلی لیتر محلول سوسپانسیون حاوی نانوکپسول های آمفوتریسین B تهیه گردید. جهت جداسازی نانوکپسول ها از ترکیبات آزاد و محصور نشده، محلول سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ گردید و بدین صورت نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B رسوب نمودند. سپس رسوب مذکور در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل گردید و با استفاده از فیلتر پلی کربنات با قطر ۵۰ نانومتر توسط دستگاه اولترافیلتراسیون میلی پور (شرکت میلی پور، مدل G=۲۰۰)، اولترا فیلتره شد و نانوکپسول های تهیه شده از نظر قطر ذره ای یکنواخت شدند. سپس به محلول به دست آمده همراه با عمل همزدن و حرارت دادن، ۵ گرم از پودر ماده آئروسیل ۲۰۰ اضافه گردید تا محلول مذکور حالت نیمه خشک به خود گرفت.

در مرحله بعد، محلول نیمه خشک ایجاد شده به دستگاه روتاری اوپوراتور منتقل شد و تحت شرایط خلاء و فشار کم به طور کامل آب گیری شد و پودر خشک نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B تهیه گردید. سپس پودر خشک تهیه شده به دقت وزن گردید و جهت مراحل بعدی تحقیقات مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق برای تهیه نانوکپسول های فاقد آمفوتریسین B به صورت پودر خشک جهت مقایسه با نانوکپسول های حاوی این آنتی بیوتیک همانند روش های گفته شده در بالا عمل گردید، با این تفاوت که از اضافه نمودن آمفوتریسین B به فرمولاسیون صرف نظر شد.

۳) روش اندازه گیری مقدار آمفوتریسین B محصور شده در نانوکپسول ها

اندازه گیری مقدار آمفوتریسین B موجود در یک گرم از پودر خشک نانوکپسول های تهیه شده به وسیله روش Tiyaboonachai و Clemons با استفاده از رسم نمودار استاندارد انجام گردید، (۱، ۷).

$$100 \times \frac{\text{مقدار آمفوتریسین B محصور شده در یک گرم نانوکپسول به درم پودر خشک}}{\text{مقدار آمفوتریسین B مصری اولیه برای تهیه یک گرم نانوکپسول به درم پودر خشک}} = \text{درصد کارایی محصورسازی}$$

شده در بالا با استفاده از بافر فسفات سالین (۰/۱۵) مولار با pH معادل (۷/۴) محلول ۰/۱ درصد تهیه شد و ۰/۸ میلی لیتر از آن به لوله های حاوی ۰/۲ میلی لیتر از محلول های تهیه شده در بالا اضافه گردید. لوله های مذکور در ۳۷ درجه سانتیگراد برای یک ساعت انکوبه گردیدند و سپس برای ۲ دقیقه در دور  $1000 \times g$  سانتریفوژ شدند. بدین صورت، در محلول رویی هموگلوبین و اجزاء گلبول های قرمز لیز شده قرار گرفتند و گلبول های قرمز لیز نشده نیز رسوب نمودند. در مرحله بعد به رسوب ایجاد شده یک میلی لیتر محلول ۰/۳ درصد تریتون  $100 \times$  اضافه گردید که این عمل سبب لیز گلبول های قرمز موجود در رسوب شد. سپس مقدار هموگلوبین آزاد شده در محلول اندازه گیری گردید. در یک لوله آزمایش دیگر به عنوان شاهد ۰/۸ میلی لیتر محلول سوسپانسیون یک درصد گلبول های قرمز ریخته شد و به آن ۰/۲ میلی لیتر بافر فسفات سالین (۰/۱۵) مولار با pH معادل (۷/۴) و یک میلی لیتر محلول ۰/۳ درصد تریتون  $100 \times$  اضافه شد. در این حالت، تمام گلبول های قرمز لیز شدند. سپس مقدار هموگلوبین در این محلول اندازه گیری و در نهایت با استفاده از معادله زیر درصد لیز گلبول های قرمز در هر لوله محاسبه گردید:

۵) روش بررسی و مقایسه اثرات سمی نانوکپسول های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و نیز فرم آزاد آن بر روی گلبول های قرمز

جهت بررسی اثرات سمی نانوکپسول های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و فرم آزاد آن بر روی گلبول های قرمز در شرایط *in vitro* از روش Chakraborty و همکارانش استفاده شد (۱۱). در این روش ۵ میلی لیتر نمونه خون سیاهرگی انسان در ظرف نمونه حاوی ۲۵۰ واحد هپارین جمع آوری گردید و سپس با دور ۴۵۰۰ برای ۵ دقیقه سانتریفوژ و پلاسما آن دور ریخته شد. سپس به گلبول های قرمز جمع آوری شده ۵ میلی لیتر بافر فسفات سالین (۰/۱۵) مولار با pH معادل (۷/۴) اضافه گردید و مجدداً عمل سانتریفوژ تکرار گردید. همین عمل ۲ بار دیگر تکرار شد و بدین صورت سوسپانسیون گلبول های قرمز شسته شده تهیه گردید. در مرحله دیگر به ۲۵۱ لوله آزمایش مقادیر ۰ تا ۲۵۰ میکروگرم آمفوتریسین B وارد شد و به هر لوله یک میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین (۰/۱۵) مولار با pH معادل (۷/۴) اضافه شد. بدین ترتیب، لوله های حاوی غلظت های ۰ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمفوتریسین B تهیه گردید. همین عمل دقیقاً برای نانوکپسول های حاوی و فاقد آمفوتریسین B نیز انجام شد. سپس از سوسپانسیون گلبول های قرمز شسته

مقدار هموگلوبین موجود در محلول رویی لوله های حاوی غلظتهای مختلف نانوکپسول های حاوی یا فاقد آمفوتریسین B و یا آمفوتریسین B به فرم آزاد

مقدار هموگلوبین موجود در لوله شاهد

به اولین لوله، ۱ میلی لیتر محلول حاوی نانوکپسول های آمفوتریسین B (با غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر) اضافه گردید و بعد از مخلوط نمودن محتویات آن ۱ میلی لیتر از آن برداشته شد و به لوله دوم اضافه گردید. همین عمل تا لوله دهم ادامه پیدا نمود و در نهایت ۱ میلی لیتر از لوله دهم برداشته و دور ریخته شد، که بدین ترتیب یک ردیف رقت در هر ۱۰ لوله تهیه گردید که غلظت آمفوتریسین B (به فرم محصور در نانوکپسول) در آن ها به ترتیب ۸، ۴، ۲، ۱،

در مرحله بعد، نمودار تغییرات درصد همولیز گلبول های قرمز در مقابل غلظت آمفوتریسین B به فرم آزاد و نیز غلظت آمفوتریسین B محصور در نانوکپسول ها رسم گردید.

۶) روش اندازه گیری حداقل غلظت مهار کننده رشد قارچ (MIC)

برای انجام این بخش، از روش رقت سازی متوالی استفاده گردید (۱۲). در این روش ابتدا ده لوله حاوی یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل آماده شد. سپس

آن تعداد کلنی‌های تشکیل شده در محیط کشت جامد شمارش گردید. در نهایت تعداد کلنی‌های تشکیل شده برای یک میلی‌لیتر محیط کشت مایع محاسبه و بعد از آن نمودار مرگ زمان تغییرات لگاریتمی تعداد کلنی‌های تشکیل شده در واحدهای زمانی ۰، ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت رسم گردید. این آزمایش در مورد محلول نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B و نیز آنتی‌بیوتیک مذکور به فرم آزاد در غلظت‌های برابر MIC تکرار شد.

#### ۱) روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این تحقیق، نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) گزارش گردید. هم‌چنین با استفاده از تست ANOVA دو طرفه، داده‌های به دست آمده مورد مقایسه قرار گرفت. در این تحقیق  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار اختلاف‌ها در نظر گرفته شد.

#### یافته‌های پژوهش

##### ۱) یافته‌های 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 (۱۱/۴۸  $\pm$  ۰/۳۱) میلی‌گرم)، کارایی محصورسازی روش جانشینی حلال برای تهیه یک میلی‌گرم از پودر خشک نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B معادل ۷۵  $\pm$  ۰/۳۱ درصد تعیین گردید.

##### ۲) یافته‌های حاصل از بررسی و مقایسه اثرات سمی نانوکپسول‌های تهیه شده حاوی و فاقد آمفوتریسین B و فرم آزاد آن بر روی گلبول‌های قرمز

نتایج این بخش از تحقیقات در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد. همان‌طور که مشخص است، شکل آزاد آمفوتریسین B و نیز فرم محصور در نانوکپسول آن با افزایش غلظت باعث همولیز تعداد بیشتری از گلبول‌های قرمز گردیده است، با این حال، اختلاف درصد همولیز بین این دو به نحوی چشمگیر معنی‌دار بود، ( $p < 0.05$ ). مثلاً، نانوکپسول‌های حاوی ۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسین B فقط ۱۴  $\pm$  ۰/۱۵ درصد گلبول‌های قرمز محیط آزمایش را همولیز نمودند، در حالی که، در همین غلظت (۳۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) آمفوتریسین B به فرم آزاد تقریباً ۱۰۰ درصد

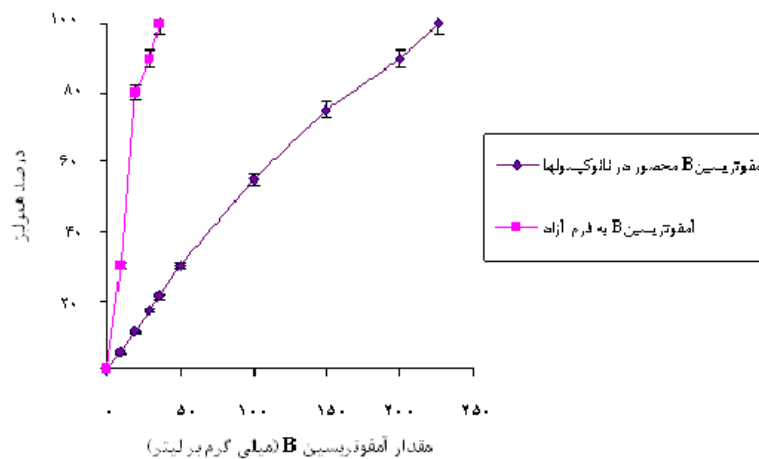
۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱ و ۰/۰۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سوش استاندارد قارچ کاندیدا آلیکانس (ATCC 90028) نیز که کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند برابر بود، آماده گردید. به هر کدام از لوله‌های فوق ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی تهیه شده اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس، از هر کدام از لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت حاوی محیط سابوردکستروز آگار منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در یک محیط کشت و محیط‌های بعد از آن، رشدی از قارچ مذکور مشاهده نگردید. غلظت آمفوتریسین B موجود در لوله‌ای که این محیط کشت از آن تولید شده بود برابر با MIC محلول نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B بود. در ادامه برای تعیین MIC محلول آمفوتریسین B به فرم آزاد و نیز نانوکپسول‌های فاقد آمفوتریسین B نیز دقیقاً همانند روش ذکر شده عمل گردید.

##### ۷) روش بررسی و مقایسه اثر نانوکپسول‌های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و فرم آزاد آن در غلظت برابر MIC به صورت *in vitro*

در این قسمت از پروژه، از روش Jung, Delogu و همکارانشان که به ترتیب در سال ۲۰۰۰ و ۲۰۰۹ میلادی به کار گرفته شده، استفاده گردید، (۱۴، ۱۳). بدین صورت، که ابتدا قارچ کاندیدا آلیکانس بر روی محیط کشت کازیتون برات کشت داده شد. پس از رسیدن درجه کدورت آن به نیم مک فارلند (CFU/ml  $5 \times 10^3$ )، ده میکرولیتر از آن برداشته و به یک لوله محیط کشت کازیتون برات حاوی یک میلی‌لیتر محلول نانوکپسول‌های حاوی آمفوتریسین B (که مقدار آنتی‌بیوتیک محصور در آن برابر با MIC محلول نانوکپسول‌های مذکور بود)، اضافه گردید و در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس در مدت زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت از محیط کشت مذکور به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت جامد سابوردکستروز آگار منتقل شد. عمل انکوباسیون برای مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور انجام گردید. بعد از

آن بر روی گلبول های قرمز(به عنوان شاخص سلول های خون و بدن) کاهش داده‌اند. لازم به ذکر است که نانوکپسول های فاقد آمفوتریسین B بر روی لیز گلبول های قرمز نداشتند، که می تواند شاخص مناسبی جهت بیان عدم سمیت پلیمرهای به کار گرفته شده در تهیه نانوکپسول ها بر روی سلول های انسانی باشد.

گلبول های قرمز مورد آزمایش را همولیز نموده است. حداکثر همولیز (۱۰۰ درصد) گلبول های قرمز در مورد نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B در غلظت ۲۲۶ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده می گردد، که برابر غلظت آمفوتریسین B به فرم آزاد می باشد. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که نانوکپسول های تهیه شده ۵/۸۹ بار سمیت آمفوتریسین B را در مقایسه با فرم آزاد



نمودار ۱. تغییرات درصد همولیز گلبول های قرمز در برابر غلظت آمفوتریسین B (آزمایش ها ۱۰ بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان گردیده‌اند)

است، مقدار MIC آمفوتریسین B برای حالت محصور در نانوکپسول ها نصف مقدار آن در فرم آزاد می باشد. بررسی اثر نانوکپسول های فاقد آنتی بیوتیک بر روی رشد قارچ مورد مطالعه نشان داد که این نانوکپسول ها تأثیری در رشد قارچ مذکور نداشتند، یعنی تعداد کلنی های قارچی تشکیل شده در حضور و یا عدم حضور این نوع نانوکپسول ها برابر بوده است.

۳) یافته های حاصل از بررسی اندازه گیری حداقل غلظت مهار کننده رشد قارچ (MIC) برای نانوکپسول های تهیه شده حاوی آمفوتریسین B و فرم آزاد آن

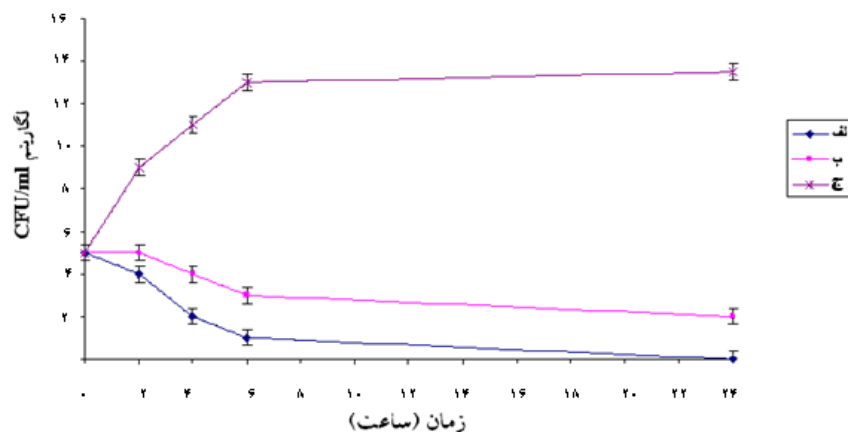
حداقل غلظت مهار کننده رشد قارچ کاندیدا آلیکانس (ATCC 90028) برای نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B و فرم آزاد این آنتی بیوتیک در جدول ۱ مشاهده می شود. همان طور که مشخص

جدول ۱. مقدار حداقل غلظت مهار کننده رشد آمفوتریسین B به فرم آزاد و محصور در نانوکپسول ها

حداقل غلظت مهار کننده رشد (میلی گرم بر لیتر)	
آمفوتریسین B به فرم آزاد	آمفوتریسین B محصور در نانوکپسول ها
۰/۵۰	۰/۲۵

همان طور که مشاهده می شود، نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B در مدت زمان ۲۴ ساعت توانسته است رشد قارچ مذکور را متوقف نماید، در حالی که فرم آزاد آن قادر به این عمل نبوده و اختلاف بین لگاریتم تعداد کلنی های تشکیل شده معنی دار می باشد. ( $p < 0.05$ )

۴) یافته ها و مقایسه اثر نانوکپسول های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و فرم آزاد آن در غلظت برابر MIC به صورت *in vitro* نمودار ۲ نشان دهنده تغییرات لگاریتمی تعداد کلنی های قارچی تشکیل شده پس از تاثیر فرم آزاد آمفوتریسین B و نانوکپسول های حاوی و فاقد این آنتی بیوتیک در غلظت های برابر MIC در طی زمان های مورد مطالعه می باشد.



نمودار ۲. تغییرات لگاریتمی تعداد کلنی های تشکیل شده در غلظت های برابر MIC نانوکپسول های حاوی و فاقد آمفوتریسین B و آنتی بیوتیک مذکور به فرم آزاد. الف: نمودار مربوط به نانوکپسول های حاوی آمفوتریسین B، ب: نمودار مربوط به آمفوتریسین B به فرم آزاد، ج: نمودار مربوط به نانوکپسول های فاقد آمفوتریسین B (قابل ذکر است که هر آزمایش ده بار تکرار گردیده است)

### بحث و نتیجه گیری

آکریلات) بوده و اثر بخشی دارو را در بدن چندین برابر افزایش می دهند، (۹). مطالعات نشان داده اند که سمیت داروی آمفوتریسین B بر روی سلول های پستانداران از طریق افزایش تشکیل منافذ موجود در غشاء سلول ها می باشد، (۱۷). نتایج این تحقیق نشان می دهد که نانوکپسول های تهیه شده حاوی آمفوتریسین B به مقدار چشمگیری از اثر همولیزی این دارو بر روی گلبول های قرمز (به عنوان نماینده سلول های بدن انسان) در مقایسه با فرم آزاد آمفوتریسین B جلوگیری می نماید. این نتیجه منطبق بر مشاهده Jung و همکارانش می باشد که گزارش نمودند نوعی نانو ذرات حامل آمفوتریسین B به نام LNP-Amb در مقایسه با آمفوتریسین B به فرم آزاد سمیت کمتری بر روی گلبول های قرمز و سلول های

امروزه تحقیقات در زمینه تولید حاملین داروی آمفوتریسین B در جهت فرمولاسیون هایی می باشد که سمیت این دارو را در بدن انسان به حداقل برسانند، بدون اینکه تأثیری بر خاصیت ضد قارچی آن داشته باشند، (۱۰). به چند دلیل موجه، تحقیقات انجام شده در این زمینه به سمت تولید نانوپارتیکل های حاوی این دارو معطوف گردیده است، که از آن جمله می توان به مواردی نظیر بهای کمتر پلیمرهای مصرفی و سمیت کمتر نانوپارتیکل های تهیه شده نسبت به سایر حاملین دارویی اشاره نمود، (۱۵، ۱۶). در این تحقیق جهت تهیه نانوکپسول ها از پلیمرهای تجزیه پذیر زیستی نظیر پلی لاکتید-کو-گلیکولید و پلی کاپرولاکتون استفاده گردید. این پلیمرها طبق تحقیق Pohlmann و همکارانش بسیار تجزیه پذیرتر از سایر پلیمرها (نظیر

شده به علت سمیت کمتر نسبت به فرم آزاد دارو می توانند به عنوان گزینه ای مناسب جهت درمان عفونت های قارچی نظیر عفونت های ناشی از کاندیدا آلبیکانس استفاده گردند. در این تحقیق، اثرات ضد قارچی نانوکپسول های تهیه شده در شرایط *in vitro* بر روی سوش استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکانس نشان از کارایی بالای آن در مقایسه با فرم آزاد دارو داشت، زیرا دوز کمتر از نانوکپسول های تهیه شده (در مقایسه با فرم آزاد آمفوتریسین B) رشد قارچ مذکور را متوقف نمود. محققى به نام Otsubo و همکارانش گزارش نمودند که نانوپارتیکل های تهیه شده حاوی آمفوتریسین B به نام NS-718 در شرایط *in vitro* کارایی بیشتری نسبت به فرم آزاد داروی مذکور در نابود ساختن قارچ *Cryptococcus neoformans* دارند، (۲۱).

در نهایت، مطالعه انجام شده نشان داد که نانوکپسول های تهیه شده می توانند به عنوان فرمولاسیونی مناسب در تهیه داروی آمفوتریسین B برای درمان بیماران قارچی مورد استفاده قرار گیرد، زیرا تعادلی مناسب بین سمیت و کارایی ضد قارچی آن وجود دارد.

### سپاس گذاری

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام گردیده است. بدین وسیله از زحمات ایشان تشکر و قدردانی به عمل می آید.

کلیدی انسان دارد، (۱۴). طبق تحقیقات Pestana و Amaral اثر همولیزی آمفوتریسین B بر روی گلبول های قرمز ناشی از هم بر کنش این دارو با کلاسترول موجود در غشا این سلول ها می باشد و محصور شدن آمفوتریسین B در نانوکپسول ها این تداخل را از بین برده و مقدار همولیز را به میزان بالا کاهش می دهد، (۲، ۱۰).

مطالعه ضد قارچی نانوکپسول های تهیه شده در شرایط *in vitro* نشان داد که بسته بندی آمفوتریسین B در این فرمولاسیون نه تنها اثر ضد قارچی داروی مذکور را کم نمی کند، بلکه اثر آن را نیز تقویت می نماید، بدین گونه که مقدار MIC به میزان ۵۰ درصد کاهش نشان می دهد. این امر، طبق نتایج به دست آمده از سایر تحقیقات، می تواند ناشی از عواملی مانند افزایش غلظت آمفوتریسین B در اطراف سلول های قارچی و نیز افزایش ورود آمفوتریسین B به این سلول ها باشد، که هر دو مورد ذکر شده از محصور شدن دارو در لایه پلیمری منشاء گرفته است، (۱۰، ۱۸). این یافته در مطالعه Clemons و Moghimi نیز اثبات گردیده، به طوری که طی تحقیقات انجام گرفته توسط محققان مذکور، میزان اثر بخشی (کاهش مقدار MIC) نانوپارتیکل های تهیه شده حاوی آمفوتریسین B به ترتیب ۲۵ و ۴۵ درصد کاهش یافته است، (۷، ۱۷). کاهش MIC نانوکپسول های تهیه شده در مقایسه با آمفوتریسین B به فرم آزاد همان طور که Lemke و Takemoto در مورد نانوذرات حاوی آمفوتریسین B گزارش نموده اند، (۱۹، ۲۰)، می تواند گویای این باشد که نانوکپسول های تهیه

### References

1-Tiyaboonthai W, Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int J Pharm* 2007; 329: 142-9.

2-Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM, Sarmiento VH, Chiavacci LA, Scarpa MV, et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery

system for amphotericin B. *Colloid Surf B: Biointerfaces* 2008; 66: 253-9.

3-Esmaeili F, Hosseini-Nasr M, Rad-Malekshahi M. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomed* 2007; 3: 161-7.

4-Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly



- (D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* 2008; 125: 193–209.
- 5-Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* 2006; 23: 1417–50.
- 6-Khandare J, Minko T. Polymer–drug conjugates: progress in polymeric prodrugs. *Prog Polym Sci* 2006; 31: 359–97.
- 7-Clemons KV, Stevens DA. Comparative efficacies of four amphotericin B formulations–fungizone, amphotec (amphocil), ambisome, and abelcet against systemic murine aspergillosis. *Anti Agent Chemother* 2004; 48: 1047–50.
- 8-Alexander BD, Wingard JR. Study of renal safety in amphotericin B lipid complex-treated patients. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 414–21.
- 9-Pohlmann AR, Weiss V, Mertins O. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres development, stability evaluation and nanostructure models *Eur Pharm Sci* 2002; 16: 305-12.
- 10-Amaral AC, Boca AL, Ribeiro AM, Nunes J. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Anti Chem* 2009; 63: 529-33.
- 11-Chakraborty KK, Naik SR. Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin B complexed with different chemically modified Beta cyclodextrins. *J Pharm Sci* 2003; 6: 231-7.
- 12-Arikan S, M. Lozano-Chiu V, Paetznick 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: 3946-51.
- 13-Delogu A, Fadda AM, Pellerano ML. Prevention by L- $\delta$ -phosphatidyl choline of antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated imidazoles determined by using time – killing curves. *Int J Anti Agent* 2000; 15: 43- 8.
- 14-Jung SH, Lim DH, Jung SH, Lee JE, Jeong KS, Seong H, et al. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. *Eur J Pharm Sci* 2009; 37: 313-20.
- 15-Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm* 2008; 361: 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: 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: 463–78.
- 18-Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 151–62.
- 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; 34: 232-8.
- 20-Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y, Sumita Y, Yoshida K, Niki K. Comparative study on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of pulmonary aspergillosis. *J Anti Chem* 2006; 57: 724-31.
- 21-Otsubo T, Maesaki S, Hossain MA, Yamamoto Y, Tomono K. In vitro and in vivo activities of NC – 718, a new lipid nanosphere incorporating amphotericin B against *Aspergillus fumigatus*. *Anti Agent Chem* 1999; 43: 471-5.

## In vitro Anti-fungal And Toxicity of Spray-dried Amphotericin B-loaded Poly Lactide-glycolide Nanocapsules

Asghari MH\*, Gharib A, Faezizadeh Z

(Received: 22 April. 2010 Accepted: 1 sep. 2010)

### Abstract

**Introduction:** Amphotericin B (AmB) is an ancient antifungal drug as well as a proper treatment for systemic fungal infection. Unfortunately, this antibiotic has shown some side effects such as nephrotoxicity. Therefore, some new AmB formulations are, nowadays, prepared to reduce its toxicity and increase effectiveness of this drug.

**Materials & Methods:** AmB nanocapsules were prepared from polymers such as poly D,L-lactide-co-glycolide by means of a solvent displacement technique. Then, the dried nanocapsules were prepared using SiO<sub>2</sub> and entrapment efficacy of AmB was measured by spectrophotometry technique. Also, the MICs of these nanocapsules to *Candida albicans* (ATCC 90028) was determined using microdilution method. Then, in vitro toxicity (haemolysis)

of AmB- loaded nanocapsules was determined on human red blood cells.

**Findings:** The data showed that AmB entrapment efficacy of nanocapsules was  $75\% \pm 0.13$ . The MICs of AmB-loaded nanocapsules against the tested *Candida albicans* were significantly reduced, compared to that of the free antibiotic. Also, the AmB-loaded nanocapsules found to be 5.89 times less toxic than free AmB on human red blood cells.

**Discussion & Conclusion:** The results suggest that the prepared AmB-loaded nanocapsules in this research can be an appropriate delivery system for AmB to be used in the treatment of fungal infections.

**Keywords:** amphotericin B, nanocapsule, *Candida albicans*, entrapment efficacy

Dept of Lab. Sciences, Faculty of Sub-Medicine, Islamic Azad University of Brojerd, Brojerd, Iran  
\*(corresponding author)

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences