**عنوان:**

طراحی و سنتز ترکیبات شیمیایی جدید براساس مدل دارویی نیتروگلیسیرین و بررسی اثر ضد قارچی آنها در سه گروه مخمری ، ساپروفیتی و درماتوفیتی در شرایط In- vitro

**مقدمه:**

کاندیدا آلبیکنس شایعترین عامل اتیولوژیک بیماری‌های ناشی از مخمرهای جنس کاندیدا می‌باشد. این قارچ علاوه بر فاکتورهای ویرولانس متعدد، با دارا بودن انواع ژن های مقاومت دارویی از جمله *CDR1* و *ERG11* یکی از مهمترین عوامل عفونت بیمارستانی اکتسابی محسوب می‌شود. عفونت‌های حاصل از گونه‌‌های آسپرژیلوسی به دلیل افزایش نقص سیستم ایمنی امروزه حائز اهمیت بسیار می‌باشند. آسپرژیلوس فومیگاتوس شایعترین و مهمترین گونه آسپرژیلوسی درسراسر دنیا می‌باشد. گونه آسپرژیلوس فلاووس در بعضی از مناطق جهان از جمله کشور ایران بعنوان شایعترین عامل آسپرژیلوزیس مهاجم گزارش شده است که این امر را به شایعتر بودن این قارچ در محیط نسبت داده‌اند. از میان درماتوفیت‌ها نیز تریکوفایتون روبروم از شایعترین عوامل عفونت‌های درماتوفیتی در سراسر دنیا بوده و عامل ۹۰٪عفونت‌های قارچی مزمن پوست می‌باشد. داروهای ضد قارچی در دسترس علاوه بر تعداد کم و ناکافی، سمیت بالایی داشته و در معرض از دست دادن خواص آنتی فانگال خود به دلیل مقاومت دارویی و ظهور سویه‌های نوظهور قارچی می‌باشند. افزایش بیماریهای قارچی به دلیل بیماری‌های نقص سیستم ایمنی‌، شیمی درمانی و.. از یک سو و تعداد کم داروهای ضد قارچی و سمیت و اثرات جانبی آنها از سویی دیگر مشکلات جدی و عدیده‌ای را در حوزه سلامت به وجود آورده است. این امر ضرورت بررسی اثرات ضدقارچی ترکیبات جدید برای بهبود و کنترل وضعیت درمان بیماری‌های قارچی را بیان می‌کند از این رو اخیرا توجه بسیاری به ترکیبات و عصاره‌های جدید به عنوان عوامل آنتی میکروبیال جدید شده است. تحقیقات بسیاری خواص آنتی میکروبیال نیتریک اکساید و ترکیبات حاوی نیتریک اکساید را به اثبات رسانده است. این ترکیبات قادرند مانع از رشد و یا کشتن طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها،قارچ‌ها، انگل‌ها ویروس‌ها شوند. نیتروگلیسرین داروی غیر آنتی بیوتیکی می‌باشد که با دارا بودن گروه‌های نیتریک اکساید در ساختمان مولکولی خود خواص ضدقارچی قابل توجهی را از خود نشان داده است. ترکیبات مشابه نیتروگلیسرین برای اولین بار توسط دکتر باقرصاد در بخش شیمی دانشگاه خوارزمی تحت عنوان نرم کننده‌های پرانرژی سنتز شدند. این ترکیبات نیترات استر دارای ساختمان مشابه با نیتروگلیسرین اما تعداد بیشتری از گروه های نیتریک اکساید میباشند.در این مطالعه با سنتزدوباره ترکیبات شیمیایی نیترات استر جدید با همکاری بخش شیمی دانشگاه خوارزمی و بررسی اثر آنها بر روی سه گروه مهم قارچی در شرایط In vitro‌، بر آن شدیم تا گامی موثر به سوی سنتز ترکیبات دارویی جدید برداریم. پس از بررسی اثرات ضد قارچی این ترکیبات با روش‌های دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهار از رشد (MIC) و مقایسه آنها به صورت کیفی با داروهای ضدقارچی فلوکونازول، آمفوتریسین B و تربینافین‌،سمیت و سایتوتوکسیتوسیتی این ترکیبات نیزبا روش MTT و رنگ آمیزی آکریدین اورنج اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت اثر این ترکیبات شیمیایی سنتز شده در بیان ژن های مقاومت دارویی *CDR1* و *ERG11* در سویه های حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس مورد ارزیابی گرفت.

**مواد و روشها:**

در مطالعه حاضر 16 سویه حساس به فلوکونازول و آمفوتریسین B  کاندیدا آلبیکنس و جهت تکمیل کار از 9 سویه مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس‌، 16 سویه حساس به آمفوتریسین B آسپرژیلوس فلاووس و 16 سویه حساس به آمفوتریسین B آسپرژیلوس فومیگاتوس مربوط به کلکسیون سویه های قارچی آزمایشگاه مولکولار مایکولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران**(**TMML**)** و 16 سویه حساس به تربینافین ترایکوفایتون روبروم ارسالی از دانشگاه علوم پزشکی اهوازمورد آزمایش قرار گرفت. علاوه بر این از سویه های استاندارد حساس و مقاوم قارچی **(**ATCC**)**  و(CWZ) هلند، به عنوان شاهد و کنترل برای هر قارچ استفاده گردید. پس از سنتز ترکیبات شیمیایی نیترات استر جدید با همکاری بخش شیمی دانشگاه خوارزمی ‌، از روش دیسک دیفیوژن طبق پروتکل استاندارد CLSI (M44-Aو M51-A) برای بررسی اولیه کارآیی و اثر ضد قارچی ترکیبات شیمیایی جدید در غلظت های مختلف استفاده شد. پس از مشاهده اثربخش بودن این ترکیبات‌، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد **(**MICs**)**  و حداقل غلظت کشندگی  **(**MFC**)** طبق پروتکل استاندارد CLSI(M38-A2و M27-A3) ارزیابی و به صورت کیفی با داروهای قارچی فلوکونازول، آمفوتریسین B و تربینافین مقایسه گردید. به منظورتکمیل مطالعه بررسی سمیت ترکیبات جدید با روش رنگ سنجی (MTT) و آکریدین اورنج اتیدیوم بروماید**(** AO/EB) انجام گرفت ودر پایان تغییرات  بیان ژن‌های مقاومت دارویی  *CDR1* و *ERG11* کاندیدا آلبیکنس حساس و مقاوم به فلوکونازول با روش  Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها**:

پس از سنتزچهار  ترکیبات شیمیایی نیترات استر مشابه با نیتروگلیسرین و نامگذاری آنها از 1b تا 4b، این ترکیبات با دستگاه های طیف سنجی NMR (Bruker AMX 300 MHz)، دستگاه طیف سنجی IR (Shimadzu 460 DR-11) و دستگاه تجزیه عنصری CHN (Perkin-Elmer 2004 series [II]) و کروماتوگرافی گازی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند که نشانگر خلوص و اختصاصیت این ترکیبات بود. نتایج حاصل از دیسک دیفیوژن با غلظت های مختلف از ترکیبات شیمیایی، نشانگر تاثیرگذاری تنها دو ترکیب 1b و 4b برروی هرچهار قارچ مورد مطالعه و به خصوص کاندیدا آلبیکنس بود. نتایج حاصل از MIC نیز نشان دهنده تاثیر مهاری ترکیبات شیمیایی 1bو 4b به ترتیب (18-72میکروگرم بر میلی لیتر) برای کاندیدا آلبیکنس حساس و مقاوم به فلوکونازول، (576**-**2304میکروگرم بر میلی لیتر) برای سویه های حساس به آمفوتریسینB آسپرژیلوس فلاووس(1152**-**4608میکروگرم بر میلی لیتر) برایسویه های حساس به آمفوتریسینB آسپرژیلوس فومیگاتوس و(288-1152 میکروگرم برمیلی لیتر) برای سویه‌های ترایکوفایتون روبروم حساس به تربینافین گزارش گردید . پس از نتایج به دست آمده جهت تکمیل مطالعه بررسی سایتوتوکسیسیتی ترکیبات با روش MTT و رنگ آمیزی AO/EB در دو غلظت (‌72 میکروگرم بر میلی لیتر) برای کاندیدا آلبیکنس و( 1152میکروگرم بر میلی لیتر) برای قارچ‌های رشته ای انجام شد که این ترکیبات  سمیت قابل قبولی را در غلظت 72 میکروگرم بر میلی لیتر در بازه های زمانی 24 و 72 ساعت ارائه کردند. در ادامه، بیان ژن های *CDR1*و *ERG11* در سویه‌های حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار گرفت که طبق یافته ها بیان هر دو ژن مورد مطالعه در مواجهه با ترکیبات شیمیایی هم در سویه های کاندیدا آلبیکنس حساس به فلوکونازول و هم در سویه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول کاهش یافتند.

**نتیجه گیری:**

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که از بین ترکیبات شیمیایی سنتز شده، دو ترکیب 1b و 4b توانایی مهار رشد هر سه گروه قارچی را با سایتوتوکسیسیتی قابل قبولی دارا بوده و قادربه کاهش بیان ژن های مقاومت دارویی *CDR1* و *ERG11* درهر دو سویه‌های حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس میباشند.

**کلمات کلیدی:** نیتروگلیسرین؛ کاندیدا آلبیکنس؛ آسپرژیلوس فومیگاتوس ؛آسپرژیلوس فلاووس؛ ترایکوفایتون روبروم؛ ژن *CDR1*‌؛ ژن *ERG11*