

## بررسی تأثیر خاصیت fungicidal ایتراکونازول در مهار بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس جهت ارائه راهکار درمانی مناسب در موارد recalcitrant onychomycosis

مهسا فتاحی<sup>۱\*</sup>  
آذین آیت‌اللهی<sup>۲</sup>

۱. مرکز تحقیقات آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
۲. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

**زمینه و هدف:** کاندیدا آلبیکنس توانایی کلونیزه کردن سطوح زنده و غیرزیست و تشکیل بیوفیلم‌هایی را دارد که در برابر ضدقارچ‌های رایج بسیار مقاوم هستند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی ایتراکونازول بروی بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس طراحی شده است.

**روش اجرا:** مطالعه حاضر بر روی ۱۰ نمونه ناخن انجام شد. آزمایش روتین قارچ‌شناسی و مولکولی جهت شناسایی و تعیین گونه قارچ انجام شد. بیوفیلم در پلیت ۹۶ خانه تشکیل شد و در مجاورت ایتراکونازول قرار گرفت. تجمع گونه‌های اکسیژن فعال ROS اندازه‌گیری و سطح ROS در بیوفیلم‌های تیمار شده با ایتراکونازول در حضور آنتی‌اکسیدان تعیین شد. اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارتی ایتراکونازول در حضور اسید اسکوربیک (۱۰ میلی‌مولار) براساس پروتکل مرحله قبل انجام شد. برای بررسی احتمال القای آپوپتوز به دنبال مصرف ایتراکونازول از کیت تشخیص آپوپتوز Annexin V-FITC استفاده شد.

**یافته‌ها:** Mann-Whitney تفاوت معنی‌داری را بین بیوفیلم‌های تیمار شده با ایتراکونازول و بیوفیلم‌های تیمار نشده برای ۱۰ سویه آزمایش شده نشان داد. درمان با ایتراکونازول منجر به کاهش قابل توجهی در تعداد بیوفیلم شد. اسید اسکوربیک به‌طور قابل توجهی تجمع ROS ناشی از ایتراکونازول را برای بیوفیلم‌های همه سویه‌های کاندیدا آلبیکنس کاهش داد. یافته‌ها نشان می‌دهد که ایتراکونازول آپوپتوز وابسته به ROS را در یک حالت وابسته به دوز در سلول‌های بیوفیلم القا می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه مشخص شد وجود ROS درون سلولی عامل اصلی مکانیسم آپوپتوز ایتراکونازول است. توانایی ایتراکونازول برای القای ROS در سلول‌های کاندیدا یک استراتژی قارچ‌کشی بسیار مؤثر به نظر می‌رسد.

**کلیدواژه‌ها:** اونیکومایکوزیس، ایتراکونازول، آپوپتوز

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۲۶

پوست و زیبایی؛ بهار ۱۴۰۲، دوره ۱۴ (۱): ۲۸-۲۴

نویسنده مسئول:  
مهسا فتاحی

تهران، بلوار کشاورز، خیابان قریب  
پست الکترونیک:  
dr.mahsafattahi@gmail.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

### مقدمه

دخیل است. کاندیدا آلبیکنس توانایی کلونیزه کردن سطوح زنده و غیرزیست و تشکیل بیوفیلم‌هایی را دارد که در برابر ضدقارچ‌های رایج بسیار مقاوم هستند<sup>۱</sup>. بیوفیلم‌ها اجتماعات میکروبی سلول‌هایی هستند که به یک سطح متصل شده و در یک ماتریکس پلیمری خارج

اونیکومایکوزیس شایع‌ترین عارضه ناخن در جمعیت بزرگسال است که ۱۵ تا ۴۰ درصد از کل بیماری‌های ناخن را تشکیل می‌دهد<sup>۱</sup>. علاوه بر کاندیدا آلبیکنس، چندین گونه دیگر کاندیدا به‌عنوان پاتوژن ناخن شناخته شده‌اند. کاندیدا آلبیکنس در عفونت‌های مختلف از عفونت‌های سطحی تا کاندیدیازیس مهاجم

گرماگذاری شدند، سپس به‌منظور خالص‌سازی ایزوله‌های کاندیدا، پاساژ مکرر از پرگنه‌های موجود بروی محیط کروم آگار کاندیدا (کروم آگار، فرانسه) انجام گرفت.

به‌منظور تفکیک گونه‌های نزدیک به هم کمپلکس کاندیدا آلبیکنس از روش مولکولی با پرایمر اختصاصی HWPI استفاده شد.

بیوفیلیم‌های کاندیدا آلبیکنس در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خانه رشد کردند. رشد بیوفیلیم‌ها با تلقیحی  $10^5 \times \text{CFU}$  کلنی به چاهک‌های میکروتیتر ۹۶ خانه آغاز شد. صفحات میکروتیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. برای ایجاد بیوفیلیم بالغ، فاز پلانکتونیک با شست‌وشو با سالین بافر فسفات حذف شد.

برای ارزیابی حساسیت دارویی این روش از پروتکل M60 استفاده شد. غلظت‌های مختلف ایتراکونازول ( $0.3/0$  تا  $32$  میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد.

برای تأیید یک عامل درون سلولی که می‌تواند باعث آپوپتوز بیوفیلیم‌های کاندیدا آلبیکنس شود، تجمع گونه‌های اکسیژن فعال ROS اندازه‌گیری شد.

اسید اسکوربیک ( $10$  میلی‌مولار) به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی برای تأیید اینکه آیا ROS با مرگ سلولی ناشی از ایتراکونازول مرتبط است، استفاده شد. سطح ROS در بیوفیلیم‌های تیمارشده با ایتراکونازول در حضور آنتی‌اکسیدان تعیین شد.

اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارتی ایتراکونازول در حضور اسید اسکوربیک ( $10$  میلی‌مولار) براساس پروتکل مرحله قبل انجام شد. پس از آن، جذب با میکروسکوپ فلورسانس اندازه‌گیری شد ( $485-535$  نانومتر). آمفوتریسین B به‌عنوان کنترل استفاده شد.

برای بررسی احتمال القای آپوپتوز به‌دنبال مصرف ایتراکونازول از کیست تشخیص آپوپتوز Annexin V-FITC (سیگما - آلدریچ، ایالات متحده آمریکا) استفاده شد.

سلولی تعبیه شده‌اند<sup>۳</sup>. تشکیل بیوفیلیم یک پدیده پیچیده است که توسط چندین فاکتور رونویسی تنظیم می‌شود و شبکه‌ای از ژن‌های هدف را کنترل می‌کند که حدود ۱۵ درصد از ژنوم را شامل می‌شود<sup>۴</sup>. بیوفیلیم‌های قارچی به‌دلیل افزایش مقاومت در برابر ضدقارچ‌ها، اهمیت پزشکی بالایی دارند. انتخاب درمان ضدقارچی اولیه برای نتیجه و هزینه بیمار بسیار مهم است. نتیجه درمان ضدقارچی سلول‌های مخمری نرمال و بیوفیلیم به‌طور کلی متفاوت است؛ زیرا سلول‌های گروه دوم مقاومت ضدقارچی بالاتری نشان می‌دهند.

از آنجایی که کاندیدا آلبیکنس می‌تواند توده بیوفیلیم روی سطح ناخن تولید کند، در مواردی که با بیمارانی مواجه هستیم که به درمان جواب نمی‌دهند یا عود بیماری در آن‌ها مکرراً روی می‌دهد، باید احتمال تشکیل بیوفیلیم مقاوم به داروی ضدقارچی را در نظر گرفت؛ لذا در انتخاب رژیم درمانی باید دارویی انتخاب شود که علاوه بر سلول‌های مخمری، بتواند اثر مهارتی بر سلول بیوفیلیم داشته باشد.

مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی ایتراکونازول بروی بیوفیلیم کاندیدا آلبیکنس طراحی شده است.

## روش اجرا

مطالعه حاضر بر روی ۱۰ نمونه جداشده از بیماران مبتلا به عفونت مزمن ناخن مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات و آموزش بیماری‌های پوستی و جذام تهران در سال ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. نمونه تراشه ناخن با اسکالپل تهیه شد و بروی اسلاید حاوی یک قطره هیدروکسید پتاسیم قرار گرفت و با لنز ۱۰ میکروسکوپ نوری، مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت.

بخشی از نمونه ناخن بروی محیط سابورو دکستروز آگار (مرک، آلمان) پاساژ داده شد. پلیت‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد

## یافته‌ها

تجزیه و تحلیل آماری با آزمون Mann-Whitney تفاوت معنی‌داری را در بیوفیلم بیوفیلم بین بیوفیلم‌های تیمار شده با ایتراکونازول و بیوفیلم‌های تیمار نشده برای ۱۰ سویه آزمایش شده (سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵) نشان داد و همچنین بیوفیلم‌های تیمار شده با آمفوتریسین B و بیوفیلم‌های تیمار نشده سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ نشان داده شد.

درمان با ایتراکونازول منجر به کاهش قابل توجهی در تعداد بیوفیلم شد. کمترین میزان کاهش برای جدایه شماره ۶ کاندیدا آلبیکنس (۰/۸۳/۹) و بیشترین کاهش برای جدایه شماره ۲ (۰/۳۵/۵) مشاهده شد.

بیشترین افزایش در تجمع ROS پس از درمان با ایتراکونازول در جدایه شماره ۷ (۳۰ برابر افزایش) مشاهده شد.

تأثیر افزودن اسید اسکوربیک بر بیوفیلم‌های تیمار شده با ایتراکونازول با استفاده از اکریدین اورنج مورد بررسی قرار گرفت. اسید اسکوربیک به‌طور قابل توجهی تجمع ROS ناشی از ایتراکونازول را برای بیوفیلم‌های همه سویه‌های کاندیدا آلبیکنس کاهش داد.

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، یک تغییر در سیگنال رنگی از قرمز به سبز در بیوفیلم‌های سویه‌های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس تحت درمان با ایتراکونازول در مقایسه با کنترل منفی مشاهده شد. یافته‌ها نشان می‌دهد که ایتراکونازول آپوپتوز وابسته به ROS را در یک حالت وابسته به دوز در سلول‌های بیوفیلم القا می‌کند.

شکل ۱: بررسی تأثیر ایتراکونازول در القا آپوپتوز. درصد کل جمعیت سلول‌های آپوپتوز به‌عنوان مجموع درصد مراحل اولیه و اواخر آپوپتوز بیان می‌شود و سیگنال فلورسانس سبز، نشان‌دهنده سلول‌های مثبت آنکسین V-FITC است. سلول‌هایی

که تنها با PI رنگ‌آمیزی شده بودند، به‌دلیل از بین رفتن یکپارچگی غشای پلاسمایی، سلول‌های نکروز در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها به شرح زیر تفسیر شد: مربع پایین سمت چپ سلول‌های زنده رنگ‌آمیزی را با غشاهای دست‌نخورده مشخص می‌کند که آنکسین V-FITC و PI هر دو منفی؛ مربع بالا سمت چپ نشان‌دهنده سلول‌های نکروزه است که PI مثبت و آنکسین V-FITC منفی؛ مربع بالا سمت راست شامل سلول‌های آپوپتوز دیررس است که آنکسین V-FITC و PI مثبت و مربع پایین سمت راست سلول‌های آپوپتوز اولیه را مشخص می‌کند که آنکسین V-FITC مثبت و PI مثبت هستند.

## بحث

در مطالعه حاضر، تجمع ROS به‌طور بالقوه در بیوفیلم‌های کاندیدا آلبیکنس درمان شده با ایتراکونازول افزایش یافته است که نشان می‌دهد ROS ممکن است مسئول فعالیت قارچ‌کشی باشد. ROS معمولاً به‌عنوان محرک‌های ضروری آپوپتوز در سلول‌های مخمر تعریف می‌شود.<sup>۵</sup> ROS پروتئین‌ها، یون‌ها، گیرنده‌ها و سایر مولکول‌های سیگنال‌دهنده را تحریک یا خنثی می‌کند.<sup>۶</sup> علاوه بر این، ROS مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با ردوکس را تنظیم می‌کند.<sup>۷</sup>

اگرچه ROS به‌عنوان مولکول‌های سیگنال در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی عمل می‌کند، ROS بیش از حد لازم به DNA داخل سلولی، پروتئین‌ها و لیپیدها حمله می‌کند و به اندامک‌ها و غشای سلولی آسیب می‌رساند و در نتیجه یکپارچگی سلول را تهدید می‌کند.<sup>۸</sup> ROS به‌عنوان عوامل مهم در التهاب، آپوپتوز و آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد در نظر گرفته می‌شود.<sup>۹</sup> مطالعات ترانسکریپتومیک نشان داد که در ساختار بیوفیلم بیان ژن‌های دفاع از استرس، به‌ویژه آن‌هایی که در مبارزه با استرس اکسیداتیو نقش دارند، در مقایسه با کشت‌های پلانکتونیک افزایش می‌یابد.

مرتبط است. هدف قراردادن سیستم دفاعی اکسیداتیو یک نقطه قدرتمند برای استفاده از ضدقارچ‌های القاکننده ROS به‌عنوان یک انتخاب برتر برای درمان‌های مؤثرتر در مورد اونیکومایکوز مقاوم به درمان و عودشونده است. در این مطالعه مشخص شد اگرچه ایتراکونازول اثر مهاری در بیوسنتز استرول دارد، این ترکیب به‌عنوان مکانیسم قارچ‌کشی در برابر بیوفیلیم‌های کاندیدا آلبیکنس باعث القای آپوپتوز می‌شود. علاوه‌براین، یافته‌های حاضر نشان داد که القای تنش‌های درون سلولی توسط ایتراکونازول در سلول‌ها پس از خاموش کردن ROS رخ نمی‌دهد که نشان می‌دهد وجود ROS درون سلولی، عامل اصلی مکانیسم آپوپتوز ایتراکونازول است. علاوه‌براین، هدف قراردادن سیستم دفاع اکسیداتیو برای بالابردن سطح ROS توسط یک تقویت‌کننده، می‌تواند فعالیت ایتراکونازول را افزایش داده و امکان استفاده از دوزهای پایین‌تر از ایتراکونازول را فراهم کند. درنهایت، توانایی ایتراکونازول برای القای ROS در سلول‌های کاندیدا یک استراتژی قارچ‌کشی بسیار مؤثر به‌نظر می‌رسد.

نتایج مشابهی در سطح پروتئومی تأیید شد. سطح ROS در مقایسه با کشت پلانکتون به‌طور چشمگیری در بیوفیلیم کاهش می‌یابد. اینکه آیا این نتیجه فعال‌شدن مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیوفیلیم‌ها است یا اینکه زندگی در ساختار بیوفیلیم منجر به کاهش تولید ROS می‌شود، مشخص نیست. داده‌های موجود ارتباط بین میزان القای ROS و فعالیت قارچ‌کشی ایتراکونازول در برابر بیوفیلیم کاندیدا آلبیکنس را تأیید می‌کند. بررسی حاضر نشان داد که اکثر سلول‌های کشته‌شده توسط ایتراکونازول آپوپتوتیک بودند. در اینجا تنش‌های اکسیداتیو منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و پروتئین، کاهش فعالیت آنزیم و آسیب DNA می‌شود. داده‌های موجود نشان می‌دهد که مرگ سلولی ناشی از ایتراکونازول به‌طور مستقیم به تجمع ROS داخل سلولی در مسیر آپوپتوز کمک می‌کند. هنگامی که آپوپتوز و مرگ سلولی رخ می‌دهد، پلی‌ساکارید به‌عنوان یک نشانگر اولیه آپوپتوز به سطح بیرونی غشای پلاسمایی منتقل می‌شود. مکانیسم قارچ‌کشی سلول مخمری ناشی از ایتراکونازول با القای آپوپتوز در کاندیدا آلبیکنس

## References

1. Aikaterini KA, Zagalioti SC, Trakatelli MG, et al. Fungal infections and nail psoriasis: An update. *J Fungi* 2022; 8:154.
2. Marak MB, Biranthabail D. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. *Int J Microbiol* 2018;2018:7495218
3. Christophe B, Jean-Marc G. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trend Microbiol* 2005, 13.1: 16-9.
4. Omayya D, et al. Repression of flagellar genes in exponential phase by CsgD and CpxR, two crucial modulators of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol* 2014, 196.3: 707-15.
5. Gianluca F, Rena B. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontier Oncol* 2012, 2: 64.
6. Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016.
7. Lee W, Lee DG. Reactive oxygen species modulate itraconazole-induced apoptosis via mitochondrial disruption in *Candida albicans*. *Free Radic Res* 2018, 52: 39-50.
8. Wu L, Xiong X, Wu X, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. *Frontier Mol Neuros* 2020,13: 28.

# Evaluation fungicidal property of itraconazole against *Candida albicans* biofilm in order to suggests a suitable treatment approach in cases of recalcitrant onychomycosis

Mahsa Fattahi, PhD<sup>1\*</sup>

Azin Ayatollahi, MD<sup>2</sup>

1. Asthma and Allergy Research Center,  
Tehran University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran

2. Center for Research and Training for  
Skin Diseases and Leprosy, Tehran  
University of Medical Sciences, Tehran,  
Iran

Received: May 06, 2023

Accepted: May 16, 2023

Pages: 24-28

## Corresponding Author:

Mehsa Fattahi, PhD

Keshavarz Blvd., Gharib St., Tehran

Email: dr.mahsafattahi@gmail.com

**Conflict of interest:** None to declare

**Background and Aim:** *Candida albicans* have the ability to colonize living and non-living surfaces and form biofilms that are very resistant to common antifungals. The present study was designed to evaluate the fungicidal activity of itraconazole on *Candida albicans* biofilm.

**Methods:** The present study was conducted on 10 nail samples. Routine mycological and molecular tests were performed to identify and determine the type of fungus. Biofilm was formed in the 96-well plate and was subjected to the itraconazole. ROS accumulation was measured. ROS levels were determined in biofilms treated with itraconazole in the presence of antioxidants. The minimum inhibitory concentration of itraconazole was measured in the presence of ascorbic acid (10 mM) according to the protocol of the previous step. Annexin V-FITC apoptosis detection kit was used to investigate the possibility of apoptosis induction following itraconazole use.

**Results:** Mann-Whitney showed a significant difference between biofilms treated with itraconazole and untreated biofilms for 10 tested strains. Treatment with itraconazole resulted in a significant reduction in the number of biofilms. Ascorbic acid significantly reduced ROS accumulation caused by itraconazole for biofilms of all *Candida albicans* strains. The findings show that itraconazole induces ROS-dependent apoptosis in a dose-dependent manner in biofilm cells.

**Conclusion:** In this study, it was found that the presence of intracellular ROS is the main cause of the apoptosis mechanism of itraconazole. The ability of itraconazole to induce ROS in *Candida* cells appears to be a very effective fungicidal strategy.

**Keywords:** onychomycosis, itraconazole, apoptosis

