

ارزیابی فعالیت ضد قارچی مشتقات جدید ایمیدازول با استفاده از روش رنگ سنجی

انسبیه لطفعلی: دانشجوی دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ensieh_4345@yahoo.com

*دکتر مهربان فلاحتی: دانشیار گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (*نویسنده مسئول). mehrabanfalahati@yahoo.com

دکتر علیرضا فرومدی: استاد دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. forumadi@yahoo.com

دکتر سعید امامی: دانشیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران. sd_emami@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲

چکیده

زمینه و هدف: افزایش شیوع عفونت‌های قارچی مهاجم طی دو دهه گذشته از طرفی و تعداد محدود داروهای ضد قارچی موثر برای درمان آن‌ها از طرف دیگر، نیاز به کشف داروهای جدید را تشدید می‌کند. امروزه داروهای موجود سبب افزایش مقاومت شده‌اند. هدف این بررسی اثر داروهای ضد قارچی جدید از مشتقات ایمیدازول با روش رنگ سنجی در مقایسه با روش میکرو دایلوژن (Micro Dillution) می‌باشد.

روش کار: این پژوهش یک مطالعه تجربی بود که در آن به بررسی اثرات ضد قارچی مشتقات جدید ایمیدازول در مقابل داروهای متداول ضد قارچی مایکونازول، کلوتریمازول و فلوکونازول بر روی سوش‌های استاندارد کاندیدا آلبیکانس (*Candida Albicans*)، ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyces cervisiae*)، اسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*) و میکروسپوروم جیپسیوم (*Microsporum gypseum*) با روش رنگ سنجی پرداختیم و نتایج آن را با روش میکرو دایلوژن برات (Broth Micro Dillution) مقایسه کردیم.

یافته‌ها: ترکیبات ۲- هیدروکسی فناسیل آزول و ۲- هیدروکسی فناسیل آزولیوم تعیین کننده یک کلاس جدید از عوامل آزولی (Azole) ضد قارچی با یک طیف فعالیت قابل قبول می‌باشند و روش رنگ سنجی یک روش میکروتیتر ساده (Simple microtiter method) برای تعیین حساسیت سوش‌های قارچی (سوش استاندارد کاندیدا آلبی کانس (PTCC 5027) - ساکارو مایسس سرویسیه (PTCC 5177) - اسپرژیلوس نایجر (PTCC 5012) - میکروسپوروم جیپسیوم (PTCC 5070) در مقابل عوامل ضد قارچی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج بدست آمده، بیشتر مشتقات در عملکرد ضد قارچی بر روی قارچ‌های تست شده، اثر قابل توجهی نشان دادند که MIC (minimum inhibitory concentration) آن‌ها در دامنه ۰/۲۵-۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با داروی استاندارد فلوکونازول بود.

کلیدواژه‌ها: ایمیدازول، تکنیک رنگ سنجی، فعالیت ضد قارچی، تست های تعیین حساسیت.

مقدمه

امروزه تنوع داروهای موثری که در پزشکی جهت عفونت‌های قارچی تجویز می‌شود، بسیار کمتر و محدودتر از داروهایی است که برای بیماری‌های باکتریایی مصرف می‌شوند. یکسان بودن داروهای ضد قارچی و محدود بودن آن‌ها، سبب افزایش مقاومت شده است بنابر این باید در زمینه یافتن داروهای ضد قارچی جدید اقدام کنیم (۱).

با توجه به گسترده‌گی ایمیدازول‌ها، اقدام به ترکیب آن‌ها در دانشکده داروسازی دانشگاه‌های

علوم پزشکی مازندران تهران توسط دکتر سعید امامی دکتر علیرضا فرومدی کردیم و در این راستا تعدادی از مشتقات جدید را بر روی قارچ‌ها بررسی نمودیم.

در هر صورت قبل از آغاز آزمایش باید این واقعیت را پذیرفت که به دلیل پیچیدگی‌های متعددی که در ساختمان، شکل، سرعت رشد و شرایط مناسب رشد قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها وجود دارد، تفسیر نتایج به دست آمده به مراتب مشکل‌تر از باکتری‌ها خواهد بود (۲-۶). روش‌های متعددی برای ارزیابی فعالیت داروهای

برای مطالعه روی ۴ سوش استاندارد کاندیدا آلبیکانس (PTCC 5027)، ساکارو مایسس سرویسیه (PTCC 5177)، آسپرژیلوس نایجر (PTCC 5012) و میکروسپوروم چیپسیوم (PTCC 5070)، آزمایش‌های رنگ‌سنجی با ماده MTT و میکروداپلوشن برات با پروتکل NCCLS M27-A برای مخمرها و با پروتکل CCLS M38-P برای قارچ‌های رشته‌ای انجام شد و در نهایت MIC داروهای تازه ترکیب شده (۲۲) داروی تازه ایمیدازولی) در برابر MIC داروهای متداول (فلوکونازول، کلوتریمازول و مایکونازول) بررسی شد (۱، ۱۶ و ۱۷).

در روش رنگ سنجی برای قارچ‌های مخمیری، از روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار، کلونی تک مخمیری برداشته و در محیط کشت TSB (Trypticase Soy Broth) تلقیح شد. با کمک اسپکتروفوتومتر از سوسپانسیون موجود قارچ‌های مخمیری (۱۸ تا ۲۴ ساعته)، یک سوسپانسیون حاوی ۱۰۵ سلول مخمیری در لوله‌های در پیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد، به این صورت که سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل LKB, Pharmacia - ساخت کشور امریکا) دارای عبور نوری (Transmittance) ۹۰٪ می‌باشد که در این حالت مقدار سلول‌های موجود در آن ۱۰۶ سلول به ازای هر میلی لیتر سوسپانسیون می‌باشد. سپس ۴،۵ سی سی سرم فیزیولوژی استریل در لوله در پیچ‌دار استریل ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۰۶ برداشته و به ۴،۵ سی سی اضافه کرده تا ۱۰۵ حاصل شود.

برای قارچ‌های رشته‌ای (کلونی ۴۸ ساعته آسپرژیلوس نایجر و کلونی ۳ تا ۵ روزه میکروسپوروم چیپسیوم) از اسپور آسپرژیلوس نایجر و از ماکروکونییدی‌های میکروسپوروم چیپسیوم در لوله‌های در پیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل، یک سوسپانسیون حاوی ۱۰۴ سلول تهیه شد (۲). در مورد رشته‌ای‌ها کفیسیت ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۰۵ برداشته و به ۴/۵ سی سی سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرده تا سوسپانسیون ۱۰۴ حاصل شود.

ضد قارچی موجود است (۷-۱۰).

هدف این بررسی اثر داروهای ضد قارچی جدید از مشتقات ایمیدازول با روش رنگ سنجی در مقایسه با روش میکرو داپلوشن می‌باشد و محدوده MIC آن‌ها در دامنه ۶۴-۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مورد ارزیابی و تفسیر قرار گرفت (۲).

روش رنگ سنجی بر اساس اندازه گیری تنفس میتوکندریایی می‌باشد که با استفاده از پلیت‌های (PLate) میکروتیتر، در حضور رقت‌های مختلف داروهای ضد قارچی انجام شده و جذب مواد توسط قارچ‌ها به وسیله این روش ثبت می‌گردد. در این مرحله، از شاخص‌های رنگ سنجی نظیر Tetrzolium Bromide و ALARM Blue استفاده می‌شود (۲، ۱۱ و ۱۲).

در این روند احیای نمک ۳- (۴،۵) دی متیل -۲- ترازولیوم بروماید (MTT) menadione-augmented (3,4,5-methyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide به فورمازان (Formazan) صورت می‌گیرد (۱۵-۱۳).

سوبسترای (Substrate) واکنش، نمک‌های محلول ترازولیوم (Tetrazolium) زرد رنگ هستند که مهم‌ترین آن‌ها MTT می‌باشد. MTT توسط سیستم ترازولیوم ردوکتاز (آنزیم سوکسینات دهیدروژناز) که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی در میتوکندری‌ها است و فقط در سلول‌های زنده یافت می‌شود، شکسته شده و به کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود. لذا میزان رنگ فورمازان تولید شده در طی آزمایش با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، ارتباط مستقیم دارد. نمک فورمازان تولید شده در آب محلول بوده و بایستی توسط ماده حلالی نظیر DMSO (دی متیل سولفو کساید Dimethyl sulfoxide)، ایزوپروپانول (Isopropanol) یا هر حلال ارگانیک دیگری به حالت محلول در آید و سپس رنگ سنجی شود (۱۱ و ۱۴).

روش بررسی

این مطالعه، مطالعه‌ای تجربی و پژوهشی بود.

یافته‌ها

نتایج فعالیت ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) نشان داد که ترکیبات اصلی بر ضد تقریباً هر ۴ سوش فعالیت داشتند. بیشتر مشتقات فعالیت ضد قارچی MIC در دامنه ۰/۲۵ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی لیترا داشتند. ترکیب ایمیدازول ۳ (I.3) با MIC برابر با ۴ میکروگرم بر میلی لیترا روی کاندیدا آلبیکنس بیشترین اثر را داشته است که در مقایسه با داروی استاندارد فلوکونازول (MIC برابر با ۸ میکروگرم بر میلی لیترا) بر روی این مخمر اثر بهتری نشان می‌دهد.

MIC مشتقات آزمایش شده بر ساکارومایسس بیان گر این است که بیشتر ترکیبات نهایی فعالیت بهتر و قابل مقایسه ای در برابر داروی مرجع دارند. در حقیقت، ترکیبات ایمیدازول ۲ I.۲ و ایمیدازول ۳ با MIC برابر با ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیترا، ۱۲۸ برابر بیشتر از فلوکونازول و ۴ برابر بیشتر از مایکونازول بر روی ساکارومایسس سرویسیه موثر بوده است.

همین طور ترکیب ایمیدازول ۱۷ (I.17) با MIC برابر با ۲ میکروگرم بر میلی لیترا فعالیتی در حد کلوتریمازول بر روی ساکارومایسس سرویسیه داشته است.

در میان ترکیبات، ترکیب ایمیدازول ۵ I.۵ فعالیت بالاتری روی آسپرژیلوس نایجر با MIC برابر با ۱۶ میکروگرم بر میلی لیترا نشان داد که در مقایسه با فلوکونازول، ۲ برابر بیشتر بود.

ترکیب ایمیدازول ۳ (I.3) با MIC برابر با ۸ میکروگرم بر میلی لیترا بر روی میکروسپوروم جیپسیوم در مقایسه با داروی استاندارد فلوکونازول نیز اثر خوبی داشت (۲ برابر بیشتر).

به طور کلی نتایج ارزیابی ترکیبات تست شده در مقایسه با داروهای استاندارد، این گونه بوده است که ترکیبات ایمیدازول ۲ و ایمیدازول ۳ نشان داده‌اند که اثر ضد قارچی بهتری روی همه سوش‌های قارچی آزمایش شده، داشته‌اند. در این ترکیبات جایگزینی حلقه آزولی با استفاده از ۱H-ایمیدازول / ۱،۲،۴-تری آزول / ۱H-۱،۲،۴-تری آزول / ۴H-۱،۲،۴-تری آزول / ۴ آمینوتری آزولیوم و ۴،۱ تری آزولیوم

سپس رقت سریال داروهای مورد نظر در میکروپلیت‌ها آماده شد و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های قارچی، پس از طی مدت زمان انکوباسیون (۲۴ ساعت در ۳۷ درجه برای مخمری‌ها و ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه برای رشته‌ای‌ها)، به میزان ۲۵ میکرولیتر محلول MTT با غلظت نهایی ۵ میلی گرم در میلی لیترا (پودر MTT در آب دیونیزه حل شد) به میکروپلیت اضافه شد و مجدداً ۳ ساعت در ۳۷ درجه برای مخمری‌ها و رشته‌ای‌ها (هر دو) انکوبه شد، سپس سانتریفوژ شد و بعد از خروج مایع رویی، به رسوب، ۱۰۰ میکرولیتر اسید ایزوپروپانول (۹۵ سی سی اسید ایزوپروپانول + ۵ سی سی اسید کلریدریک یک نرمال) افزوده تا فورمازان حاصله حل شده و در دستگاه الیزا ریدر (ساخت کشور آمریکا. مدل Dynex MRX) در طول موج ۵۵۰ نانومتر جذب نوری فورمازان خوانده شد. بر اساس فرمول زیر، درصد حیات سلولی محاسبه گردید.

$$\frac{((X1 - OD \text{ blank}) \times 100)}{(OD \text{ control} - OD \text{ blank})}$$

در فرمول فوق OD (Optical density) بلانک، چگالی نوری چاهک‌های بدون سلول قارچی و OD کنترل چگالی نوری چاهک‌های حاوی سلول قارچی است که فاقد دارو است و ۱۰۰ می باشد. چاهک شماره ۱۱ که حاوی محیط کشت و سلول قارچی است و فاقد دارو می باشد به عنوان شاهد مثبت و کنترل می باشد و چاهک شماره ۱۲ که فقط حاوی محیط کشت و بدون سلول قارچی و دارو می باشد، به عنوان شاهد منفی و بلانک می باشد.

اثرات ضد قارچی داروهای متداول کلوتریمازول، فلوکونازول، مایکونازول و ترکیبات جدید روی سوش‌های استاندارد کاندیدا آلبیکنس، ساکارومایسس سرویسیه، آسپرژیلوس نایجر و میکروسپوروم جیپسیوم با دو روش میکرودایلوشن برات و رنگ سنجی در محدوده MIC در دامنه ۰/۱۲۵-۶۴ میکروگرم بر میلی لیترا تعیین گردید.

جدول ۱. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر حاصل از سنجش اثرات ضد قارچی مشتقات ایمیدازول بر روی ۴ سوش قارچی استاندارد با ۲ روش میکروداپلوشن برآث و رنگ سنجی.

ردیف	کاندیدا آلبیکنس		ساکارومایسس سرویسیه		آسپرژیلوس نایجر		میکروسپوروم جیسیوم	
	میکروداپلوشن	کلریمتری	میکروداپلوشن	کلریمتری	میکروداپلوشن	کلریمتری	میکروداپلوشن	کلریمتری
MIC فلوکونازول	۸	۸	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶
MIC کلوتریمازول	۲	-/۵	۴	۲	۲	۱	۳۲	۳۲
MIC مایکونازول	۱	-/۵	۱	۱	۱	۲	۲	۸
MIC ایمیدازول ۱	۳۲	۱۶	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۲	۶۴	۶۴	-/۲۵	-/۲۵	۶۴	۶۴	۳۲	۱۶
MIC ایمیدازول ۳	۸	۴	-/۲۵	-/۲۵	۱۶	۱۶	۸	۸
MIC ایمیدازول ۴	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۵	۳۲	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
MIC ایمیدازول ۶	۱۶	۱۶	۱۶	۸	۳۲	۱۶	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول ۷	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۸	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶
MIC ایمیدازول ۹	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۱۰	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۱۶	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۱۱	۶۴	۶۴	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۱۲	۱۶	۸	۱۶	۱۶	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
MIC ایمیدازول ۱۳	۶۴	۶۴	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول ۱۴	۶۴	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
MIC ایمیدازول ۱۵	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶	۱۶	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول ۱۶	۶۴	۶۴	۳۲	۳۲	۶۴	۶	۳۲	۳۲
MIC ایمیدازول ۱۷	۸	۸	۲	۲	۶۴	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۱۸	۶۴	۶۴	۱۶	۱۶	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول ۱۹	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول ۲۰	۱۸	۸	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول ۲۱	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۱۶
MIC ایمیدازول ۲۲	۶۴	۳۲	۳۲	۳۲	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴
MIC ایمیدازول ۲۳	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۳۲	۳۲	۶۴	۳۲
MIC ایمیدازول ۲۴	۴	۸	-/۵	۱۶	۱۶	۱۶	۶۴	۶۴

با داروهای استاندارد بوده است.

بحث و نتیجه گیری

در روش رنگ سنجی از فعالیت متابولیک قارچها بر اساس تنفس میتوکندری استفاده شده است که با اندازه گیری کمی فورمازانی که از MTT به دست می آید. می توان برای ارزیابی حیات سلولی یا مرگ آن، سلول های یوکاریوت استفاده نمود. به طور کلی انواع حلقه های آزول و اتم کلرین به ۴ موقعیت بخش فناسیل وصل شده و به نظر می رسد که تاثیرات مختلفی روی فعالیت ضد قارچی سوش های مختلف قارچی دارد (۱۰). مخمرها (کاندیدا آلبیکنس و ساکارومایسس سرویسیه) به طور ویژه به نظر می رسد که نسبت به هر دو تغییر در الگوی جانیشینی حلقه آزول و بخش فناسیل حساس هستند. از مزایای این تست، دقت و پرهیز از کاربرد

به جای اسکلت ۲ هیدروکسی استوفنون صورت گرفته است.

در ترکیب I.3 به طور واضح فعالیت بیشتری دیده می شود. در این ترکیب به جای اتم کلر یا هیدروژن، آنالوگ ۴ متوکسی فناسیل ایمیدازول قرار گرفته و اثر آن روی کاندیدا آلبیکنس بیشتر شده است. بنابراین بخش متوکسی از ایمیدازول فناسیل سبب افزایش فعالیت ضد قارچی می شود. نتیجه این است که ترکیبات ۲-هیدروکسی فناسیل آزول و ۲-هیدروکسی فناسیل آزولیوم می تواند تعیین کننده یک کلاس جدید عوامل آزولی ضد قارچی با یک طیف فعالیت قابل قبول باشد.

بیشتر مشتقات در فعالیت ضد قارچی بر روی قارچ های تست شده، عملکرد قابل توجهی نشان دادند که MIC آنها در دامنه ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تا ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه

فلوکونازول و ۵-فلوسیتوزین انجام شد، نتایج بیانگر این بود که یافته های رنگ سنجی برای آزمایش های حساسیت ضد قارچی قابل اعتماد می باشد و این روش می تواند به عنوان روش استاندارد برای مخمرها معرفی شود (۱۳).

در تحقیق مورد اشاره، تعداد ۱۰۰ ایزوله مخمری (از چندین آزمایشگاه جمع آوری شده بود) که با روش رنگ سنجی در برابر داروهای آمفوتریسین B و فلوکونازول ارزیابی گردیدند. همزمان ۵ ایزوله مخمری استاندارد دیگر به عنوان کنترل بررسی شدند. در نهایت ۹۹/۴٪ نتایج در برابر فلوکونازول و ۹۸/۶٪ در برابر آمفوتریسین B با نتایج حاصله از سوش های استاندارد هم خوانی داشتند (۱۴).

مایکل روش میکرودايلوشن را با روش رفرانس ماکرودايلوشن NCCLS M27-P بر روی ده ایزوله مخمری در مقابل ۵-فلوسیتوزین و آمفوتریسین B و فلوکونازول را مقایسه کرد. هم خوانی نتایج میان MIC های به دست آمده برای آمفوتریسین B ۰.۸۶٪، برای فلوکونازول ۰.۹۰٪ و برای ۵-فلوسیتوزین ۰.۹۳٪ در دو روش بود. در نهایت استفاده کاربردی از روش کلریمتری در آزمایشگاه های کلینیکی توصیه شد (۱۵).

در سال ۱۳۸۶ مشتقات جدید ایمیدازول و تری آزول توسط امامی و فرومدی سنتز شد و تحت نظر فلاحتی، اثرات ضد قارچی و MIC آن ها تعیین شد (۱۶).

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه انسیه لطفعلی در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر مهربان فلاحتی و مشاوره دکتر علیرضا فرومدی در سال ۱۳۸۶ و کد ۱۰۵۱-۱ می باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است. نویسندگان این مقاله به این وسیله مراتب قدردانی خود را از جناب آقای دکتر رضا فلک اعلام می دارند.

هرگونه ترکیب پرتوزا می باشد و چون بین طول موج حداکثر جذب سوپسترا (MTT) با محصول واکنش تفاوت زیادی هست، هیچ مرحله شستشویی در طی مراحل آزمون وجود ندارد. ما این روش را به عنوان یک روش میکروتیتر ساده برای آزمایش های حساسیت دارویی ۴ سوش قارچی استاندارد و ۲۲ مشتق ایمیدازولی استفاده کردیم. نتایج بیانگر این واقعیت بود که فعالیت تنفسی میتوکندریال می تواند به صورت کمی با یک پروسه رنگ سنجی ساده بیان شود. در این بررسی نتایج آزمایش های انجام شده به روش رنگ سنجی و نیز روش میکرودايلوشن برات با یکدیگر هم خوانی داشت. ضمناً این نتیجه به دست آمد که روش رنگ سنجی به سادگی برای سایر قارچ ها و عوامل ضد قارچی قابل تعمیم می باشد. اگر چه هنوز به طور گسترده برای ارزیابی تست های حساسیت دارویی قارچ ها کاربردی نشده است.

در مورد محدودیت های پژوهش می توان گفت به موجب ناچیز بودن مقدار داروهای تازه ترکیب شده، انجام آزمایشات گسترده تر بر روی سوش های قارچی بیشتر امکان پذیر نبود.

در تحقیقی که در ۱۹۹۴ انجام شد، در آزمون رنگ سنجی با نمک MTT سوش کاندیداآلبیکنس و آسپرژیلوس فومی گاتوس کردند. نتایج بیانگر این مطلب بود که این روش برای بررسی اثرات عوامل ضد قارچی جدید کاملاً قابل اعتماد می باشد و نتایج سوش های مخمری و هایفی دقیقاً با نتایج حاصل از روش ماکرودايلوشن برات همخوانی دارد (۲).

در پژوهش دیگری از روش رنگ سنجی با نمک MTT برای ارزیابی قابلیت حیات آسپرژیلوس فومی گاتوس و رایزوپوساوریزه و کاندیداآلبیکنس استفاده کرد و در نهایت یک رابطه خطی بین میزان تلقیح سوسپانسیون و احیا MTT به دست آوردند و استفاده از این روش را به عنوان روشی ساده و جدید برای ارزیابی بقای سلول های قارچی توصیه کردند (۱۲).

در آزمون رنگ سنجی که بر روی سوش های کاندیدا و تورولوپسیس، گلابراتا و کریپتوکوکوس نیوفرمنس در برابر داروهای آمفوتریسین B و

13. Pfaller M, Barry AL. Evaluation of a novel colorimetric Broth Micro-dilution Method for Antifungal Susceptibility Testing of yeast isolates. *Journal of clinical microbiology*.1997; 1: 1992-1996.
14. Pfaller M, Espinel A, Moore S. Multisite Reproducibility colorimetric Broth Microdilution Method for Antifungal Susceptibility testing of yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiolog* 1995; 1:1628- 1635.
15. Michael A, Pfaller M, Barry B. Multicenter comparison of a colorimetric Broth Micro-dilution Method with the reference macrodilution method for in vitro susceptibility testing of yeast isolates. *Diagn Microbial Infect Dis* 1994;1:9-13.
16. Emami S, Forumadi A, Falahati M, Lotfali E, et al. 2-Hydroxyphenacyl azoles and related azolium derivatives as antifungal agents. *BMCL* 2007; 1:1010-16.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard M27A, NCCLS, Wayne, PA. 2002.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Filamentous Fungi approved standard M38-p, NCCLS, Wayne, PA. 2002.

منابع

1. Jahn B, Martin E, Stueben A, Bhakdi S. Susceptibility Testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* Species by a Simple Microtiter Menadione-Augmented 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide Assay. *American Society for Microbiology*; 1995.661-667.
2. Alcezar Fuoli L, Rodriguez-Tudela JL, Mellado E. Antifungal drug resistance in molds. *Clinical and Microbiological Factors* 2008; 2: 36-42.
3. Rex JH, Pfaller MA, Whaksh T, Chatarvedi. Antifungal susceptibility testing practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Review*. 2001. 6;367-381.
4. Kumar R, Shrivastava S, Chakraborti R. Comparison of Broth dilution and disc diffusion method for the antifungal susceptibility testing of *Aspergillus flavus*. *Am J Biomed Sci* 2010; 2(3): 202-208.
5. Lass-Flörl C, Perkhofer, Mayr A. In-Vitro susceptibility testing in fungi. *Global perspective on a variety of methods*. *Mycoses* 2010; 53: 1-11.
6. Clancy C, Neguyen M H. Correlation between in vitro susceptibility determined by E-test and response to therapy with amphotericin B: result from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrobial Agents Chmother*.1999; 4, 3:1289-1290.
7. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility test dilution and diffusion methods. In: Murray E J, Pfaller M A, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press. 7th ed. 1999; 1: 1526-1543.
8. Espinel-Ingoroff A, Kerkering TM, Goldson P R. Comparison study of macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*.1991;29:1080- 1094
9. Wronock WD. Method with antifungal drugs. In: Tikyo, Evanse EG, Richardson ND. *New York: Irl Press at oxford University Press. Medical Mycology* 1989; 1: 235- 259.
10. Odd FC, Geruen FV, Espinel-Ingoroff A, Bartlett MS, Ghan MA, Lancaster MV, et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungus in-vitro and fungal treatment outcomes in animal infection models. *Anti Microb Agents* 1998; 42: 282-288.
11. Espinel-Ingoroff A. In-Vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 954-958.
12. Diamond R, Stuart M, Richard d. A Rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *Journal of infectious Disease*.1985; 152, 5: 12-19.

Evaluation of Antifungal activity of new derivatives of Imidazole using Colorimetric method

Ensieh Lottfali, PhD. Resident of Mycology, Health Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ensieh_4345@yahoo.com.

* **Mehraban Falahati, PhD.** Associate Professor of Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (*Corresponding author). mehrabanfalahati@yahoo.com

Alireza Foroumadi, PhD. Professor of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. aforoumadi@yahoo.com.

Saied Emami, PhD. Associate Professor of Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Mazandaran, Iran. sd_emami@yahoo.com

Abstract

Background: The incidence of invasive fungal infections has been increasing for two decades. A matter of concern in the treatment of fungal infections is the limited number of efficacious antifungal drugs. Many available drugs lead to the development of resistance. In order to seek new antifungal agents we assessed the antifungal activity of newly synthesized Imidazole compounds by a colorimetric method.

Methods: In this experimental study antifungal activity of the new Imidazole compounds against *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Microsporum gypseum* was investigated by colorimetric method and results were compared to microdilution ones.

Results: 2-hydroxyphenacyl-azole and 2-hydroxyphenacyl-azolium compounds have been identified as a new class ofazole antifungal agents with a good spectrum of activity. The colorimetric method is a simple microtiter method for determining the susceptibility of species of fungi against antifungal agents.

Conclusion: Most derivatives showed significant in vitro antifungal activities against tested fungi with low MIC (minimum inhibitory concentration) values included in the range of 0.25-32 µg/mL comparable to the reference drug Fluconazole.

Keywords: Imidazole, Colorimetric method, Antifungal activity, Susceptibility tests.