

# Preparation and Evaluation of the Effects of Microemulsion Containing Honey and Sesame Oil on Candidate Sepsis in Mouse

Amir Biriaei<sup>1</sup>, Nafiseh Farhadian<sup>1</sup>, Faranak Dehghani<sup>1</sup>, Shiva Gol Mohammadzadeh<sup>2</sup>, Mahmoud Ebrahimi<sup>3</sup>, Mohammad Karimi<sup>4</sup>, Mohammad Reza Kazemi<sup>5</sup>

1. Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Dept. of Pharmaceutics, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3. Cardiology Department, Medicine Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4. Emergency Medicine Department, Ahwaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran

5. Medicine Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received: 2017/09/5      Accept: 2018/08/7)

## Abstract

**Background:** Sesame oil has anti-candidiasis therapeutic effects. Due to hydrophobic property of oils, their solubility in aqueous media is low which causes their low absorption and impact on the reduction of microbe compactness in the body. The aim of the present study was preparation of a mixture containing sesame oil and honey based on microemulsion form.

**Materials and Methods:** An experimental study was conducted. Tween 80 as surfactant and honey as co-surfactant with various proportions of surfactant/co-surfactant as 4:1, 2:1, and 5:1 were selected to plot pseudo ternary phase diagram. Microemulsion preparation was performed based on the titration method. An *in vivo* study was performed on 12 BALB/C mice which were divided into two groups. Each group had six mice as the control group and drug consumer group (microemulsion including honey and sesame oil).

**Results:** Physicochemical properties of the microemulsion samples showed that the mean particle size is in the range of 24.09-16.62 nm with a homogeny particle size distribution between 0.33-0.28. Zeta potential was in the range of 16.5-10.3- and refractive indices and conductivity coefficient were about 1.39 and 279-249  $\mu\text{S}$ , respectively. These results confirm the formation of oil in water microemulsion due to calculated refractive indices near water value, higher value of conductivity coefficient, and small particle size. Stability test during time showed that samples with 2:1 surfactant to co-surfactant ratio were not stable after two months. Samples with 4:1 surfactant/co-surfactant ratio were selected for *in vivo* evaluation due to higher stability and oil content.

**Conclusion:** It seems that using emulsion is effective in contamination with fungi in blood culture and increased peritoneal macrophages in mice.

**Keywords:** Microemulsion; Candidate sepsis; surfactant; Sesame oil; Honey; Peritoneal macrophage

\*Corresponding author: Nafiseh Farhadian  
Email:n.farhadian@um.ac.ir

## بررسی تاثیر میکرومولسیون خوراکی روغن کنجد و عسل بر سپسیس کاندیدیایی موش صحرائی

امیر بی‌ریایی<sup>۱</sup>، فرانک دهقانی<sup>۱</sup>، نفیسه فرهادیان<sup>۱\*</sup>، شیوا گل محمدزاده<sup>۲</sup>، محمود ابراهیمی<sup>۳</sup>، محمد کریمی<sup>۴</sup>،

محمدرضا کاظمی<sup>۵</sup>

- ۱- گروه مهندسی شیمی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
 ۲- گروه فارماسیوتیکس دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران  
 ۳- گروه قلب و عروق، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران  
 ۴- گروه طب اورژانس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز  
 ۵- دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۱۴

### چکیده:

**سابقه و هدف:** روغن کنجد دارای اثر درمانی بر سپسیس کاندیدیایی است اما به دلیل ماهیت آب‌گریزی روغن‌ها، حلالیت آن‌ها در محیط‌های آبی پایین بوده و میزان جذب و اثرگذاری این ترکیب‌ها در کاهش آلودگی بدن به فارچ پس از مصرف خوراکی چندان مطلوب نیست. هدف از انجام این مطالعه، تهیه روغن کنجد و عسل به فرم میکرومولسیون است.

**مواد و روش‌ها:** تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. توین ۸۰ به عنوان سورفکتانت و عسل در نقش کوسورفکتانت نوین با نسبت‌های سورفکتانتی ۲:۱، ۴:۱ و ۵:۱ برای رسم نمودارهای شبه سه‌فازی انتخاب شده و تهیه میکرومولسیون با روش تیتراسیون انجام گرفت. برای بررسی کارایی درون‌تن نمونه‌ها، ۱۲ رأس موش مدل Balb C ماده انتخاب و در دو گروه ۶ تایی کنترل و مصرف‌کننده دارو (فرم میکرومولسیون روغن کنجد-عسل) دسته‌بندی شدند. **یافته‌ها:** تعیین خصوصیات فیزیکی-شیمیایی، میانگین اندازه ذرات نمونه‌ها در محدوده ۱۶/۶۲-۲۴/۰۹ نانومتر، شاخص توزیع اندازه ذرات در محدوده ۰/۲۸-۰/۳۳، پتانسیل زتا در محدوده ۱۰/۳-۱۶/۵، شاخص شکست نور در حدود ۱/۳۹ و ضریب هدایت الکتریکی در محدوده ۲۴۹-۲۷۹ میکروزیمنس تعیین شد. این نتایج به علت نزدیکی شاخص شکست نور نمونه‌ها به شاخص شکست نور آب، بالا بودن ضریب هدایت الکتریکی نمونه‌ها و ریز بودن اندازه ذرات همراه با توزیع یکپارچه آن‌ها حاکی از غالب بودن فاز آبی و در نتیجه شکل‌گیری میکرومولسیون روغن در آب بوده است. در بررسی پایداری نمونه‌های تهیه شده با گذشت زمان، پس از گذشت دو ماه، ناپایداری در نمونه تهیه شده با نسبت سورفکتانتی ۲:۱ به صورت کدر شدن مشاهده شد. به دلیل پایداری بالاتر و نیز درصد روغن بالاتر در نسبت ۴:۱ این نمونه برای بررسی کارایی درون‌تن انتخاب شد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد مصرف این امولسیون در میزان آلودگی به فارچ در کشت خون و افزایش ماکروفاژهای صفافی در موش‌های مصرف‌کننده موثر است.

**واژگان کلیدی:** میکرومولسیون، سپسیس کاندیدیایی، سورفکتانت، روغن کنجد، عسل، ماکروفاژهای صفافی.

### مقدمه:

ایمنولوژیک در آن نقش بسیار مهمی دارند. با وجود استفاده وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها و آنالوگ‌های سنتزی آن‌ها، هنوز جست‌وجو برای یافتن عوامل ضد آلودگی جدید لازم است، زیرا برخی از عوامل آنتی‌باکتریال مهم عوارض جانبی جدی و شدیدی دارند (۲). توسعه درمان‌های ایمنومدولاتوری یکی از فرضیه‌های اصلی در درمان‌های جدید سپسیس است (۳). برخی از ترکیب‌های گیاهی که سال‌ها پیش در طب سنتی کشورهای مختلف برای درمان عفونت‌ها استفاده شد، دارای آثار ضد قارچی و ضد باکتریایی بر انواع عفونت‌ها است. ون دن بوت و همکارانش اثر ۱۲ عصاره گیاهان تانزانایی را بر عفونت کاندیدیایی بررسی کرده و نشان داده‌اند که

کاندیدایزیس<sup>۱</sup> منتشره یک بیماری تهدیدکننده حیات با میزان مرگ و میر بالاتر از ۴۰ درصد است. کاندیدا البیکنس<sup>۲</sup> چهارمین ارگانیسم جدا شده از عفونت‌های جریان خون در بیماران بستری در بیمارستان است (۱). سندرم سپسیس یک پاسخ سیستمیک به عفونت‌های باکتریایی از جمله کاندیداسیس است؛ به نحوی که پاسخ‌های

- 1 Candidiasis
- 2 Candida albicans

شدن برای توپین ۸۰ کمتر از سایر انواع توپین بوده و تهیه میکرومولسیون با غلظت‌های پایین‌تری از آن امکان‌پذیر است. در نهایت توپین ۸۰ به دلیل HLB مناسب، زیست‌سازگاری بالاتر و CMC کمتر، به عنوان سورفکتانت انتخاب شد. در برخی موارد از ترکیب‌های گیاهی و طبیعی به عنوان جایگزین کوسورفکتانت‌های شیمیایی در تهیه میکرومولسیون‌های خوراکی استفاده می‌شود. از شکر (ساکروز) به عنوان کوسورفکتانت در کنار سورفکتانت توپین ۸۰ در تهیه میکرومولسیون‌های خوراکی حاوی روغن تخمه کدو و روغن آفتابگردان در مطالعات پیشین استفاده شده است (۱۴). در این تحقیق عسل به عنوان کوسورفکتانت گیاهی نوین در کنار سورفکتانت توپین ۸۰ به عنوان کوسورفکتانت انتخاب شد. عسل علاوه بر ایفای نقش کوسورفکتانت، با خاصیت ضد باکتریایی خود برای درمان سپسیس نیز موثر است.

مقادیر CMC سورفکتانت‌های زیست‌سازگار آب‌دوست (۱۵)

نام سورفکتانت	مقدار CMC
توپین ۲۰	۴۹۹ درصد
توپین ۴۰	۳۳۳ درصد
توپین ۶۰	۱۶۷ درصد
توپین ۸۰	۱۵ درصد

انتخاب نسبت‌های سورفکتانتی: نسبت‌های سورفکتانتی معادل با ۲:۱، ۴:۱ و ۵:۱ (از عسل: توپین ۸۰) انتخاب شد. با بررسی نتایج، تفاوت قابل توجهی بین شکل و وسعت ناحیه پایدار میکرومولسیونی در نسبت‌های جرمی ۴:۱ و ۵:۱ مشاهده نشد. مقادیر توپین ۸۰ و عسل طبق جدول زیر در نسبت‌های مختلف سورفکتانتی به صورتی تعیین شد که علاوه بر قابلیت اختلاط کامل و مناسب، امکان مشاهده دقیق شکل ظاهری نمونه‌ها با توجه به حجم نهایی آن‌ها فراهم باشد. لازم به ذکر است جرم توپین ۸۰ برای سهولت در نتیجه‌گیری نهایی ثابت نگه داشته شده و مقدار عسل با توجه به نسبت‌ها تغییر یافت.

مقادیر جرمی توپین ۸۰ و عسل با نسبت‌های مختلف در نمونه‌های تهیه شده برای رسم منحنی شبه‌سه‌فازی

جرم عسل میلی‌گرم	جرم توپین ۸۰ میلی‌گرم	نسبت سورفکتانتی (عسل / توپین ۸۰)
۷۵۰	۱۵۰۰	۲:۱
۳۷۵	۱۵۰۰	۴:۱
۳۰۰	۱۵۰۰	۵:۱

**رسم نمودار شبه سه فازی:** برای رسم نمودار شبه سه فازی، پس از نام‌گذاری رئوس و اختلاط سورفکتانت‌ها با نسبت‌های سورفکتانتی معین، روغن کنجد با درصد‌های ده‌گانه ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ به فاز سورفکتانتی افزوده شد. هر مخلوط دوجزئی تهیه شده، بر روی همزن مغناطیسی اختلاط یافته، همزمان آب مقطر به آن اضافه شده و پیوسته تغییرات

این گیاهان می‌توانند انتخاب خوبی برای درمان جدید عفونت‌های چارچی بدن باشند (۴). در مطالعه آکاگاو و همکاران نیز نشان داده شده است که برخی گیاهان دارویی ژاپنی از طریق افزایش فعالیت ضد کاندیدیایی ماکروفاژها بر عفونت‌های سیستمیک کاندیدیایی اثر حفاظتی داشته و باعث افزایش بقای موش‌های آلوده نیز می‌شوند (۵). بر اساس مطالعه Seemivasan<sup>۳</sup> و همکارش مشخص شد که روغن کنجد به عنوان یک منبع گیاهی دارویی با پیشینه مصرف خوراکی بسیار و ارزش غذایی بالا دارای اثر درمانی بر سپسیس است (۶). اما ترکیب‌های چربی دوست نظیر روغن‌ها پس از ورود به بدن با مشکل حلالیت در محیط آبی مواجه شده و جذب و اثر بخشی آن‌ها پس از مصرف خوراکی در حد مطلوبی نخواهد بود. میکرومولسیون‌ها با استفاده از سورفکتانت‌ها قابلیت ایجاد اتصال پایدار بین مواد آب‌گریز و محیط آبی را فراهم کرده و می‌توانند به عنوان روشی کارآمد در بهبود حلالیت و اثرگذاری ترکیب‌های چربی دوست استفاده شوند. میکرومولسیون‌ها مایعات همگن با اندازه ذراتی در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند (۷، ۸). این سامانه‌ها به لحاظ ترمودینامیکی به طور کامل پایدار بوده و به جهت اندازه ریز ذرات بر خلاف امولسیون‌های معمولی، از شفافیت بسیار بالایی برخوردار هستند (۸، ۹). در این ساختار برای بهبود انعطاف لایه سورفکتانت در اطراف فاز پراکنده، کاهش کشش سطحی و افزایش بیشتر پایداری در فصل مشترک روغن و آب، جزء دومی تحت عنوان کوسورفکتانت در کنار سورفکتانت قرار می‌گیرد (۱۰). در برخی موارد سورفکتانت ثانویه با ماهیت آب‌دوستی متضاد در کنار سورفکتانت اول، فاز سورفکتانتی را تشکیل می‌دهند (۸، ۱۱). در پژوهش حاضر روغن کنجد به عنوان یک ترکیب گیاهی مؤثر در درمان سپسیس کاندیدیایی برای اولین بار به کار برده شده است. برای افزایش حلالیت این روغن در محیط مایبی بدن، از فرم میکرومولسیون روغن در آب استفاده شده است. نمونه میکرومولسیون حاوی روغن کنجد به همراه مخلوط سورفکتانت توپین ۸۰ و کوسورفکتانت طبیعی و نوین عسل تهیه شده است. وجود انواع فنولین‌ها در عسل به عنوان منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌ها و خاصیت ضدباکتریایی آن، در کنار روغن کنجد یک فرآورده گیاهی مؤثر در درمان سپسیس کاندیدیایی را فراهم آورده است (۱۲، ۱۳). نوآوری دیگر این پژوهش، حذف یک کوسورفکتانت شیمیایی و جایگزینی آن با عسل است که در کاربردهای دارویی مطلوب است. در این مطالعه از روش تیتراسیون با هم‌زدن ملایم و همچنین از نمودار شبه‌سه‌فازی در تهیه میکرومولسیون‌ها استفاده شده که طی آن سورفکتانت آب‌دوست در اطراف فصل مشترک روغن و آب جای می‌گیرد. به این ترتیب فاز روغنی به عنوان فاز پراکنده به صورت ذراتی با اندازه نانومتری در فاز پیوسته آبی قرار گرفته و میکرومولسیون روغن در آب را تشکیل می‌دهد. پس از تهیه نمونه‌های میکرومولسیون، تعیین خصوصیات فیزیکی-شیمیایی آن‌ها اعم از اندازه ذرات، پتانسیل زتا، هدایت الکتریکی، شاخص شکست نور، pH و میزان پایداری انجام گرفته است. همچنین تاثیر درمانی روغن کنجد و عسل در ساختار میکرومولسیون بر سپسیس کاندیدیایی در موش Balb/C بررسی شده است.

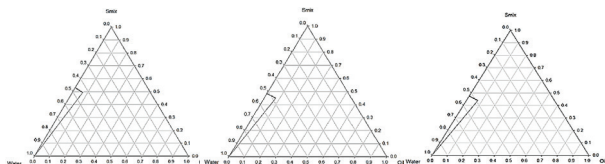
## مواد و روش‌ها:

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. روغن پایه، روغن کنجد تهیه شده توسط شرکت ثمر است. سورفکتانت توپین ۸۰ (پلی سوربات ۸۰) از شرکت دارویی مرک آلمان تأمین شد. عسل به کار رفته، عسل منطقه نیشابور است. برای تهیه نمونه‌های میکرومولسیون از آب مقطر دو بار تقطیر بهره‌گیری شد. حیوانات آزمایشگاهی برای بررسی کارایی درون تن نمونه‌های میکرومولسیون شامل ۱۲ رأس موش Balb/C ماده با سن ۶-۸ هفته است که از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شد.

برای تهیه میکرومولسیون خوراکی بر پایه روغن کنجد، سورفکتانت‌هایی با مقادیر HLB بالاتر و ماهیت آب‌دوستی غالب مانند دسته توپین‌ها مناسب هستند. استفاده از توپین ۸۰ در تهیه میکرومولسیون‌های خوراکی بیشتر از انواع دیگر آن انجام گرفته است. از طرفی بر اساس جدول زیر، مقدار غلظت بحرانی مایسلی

تزریق، نمونه میکرومولسیون با دوز ۰/۱ میلی لیتر بر کیلوگرم به موش های گروه مصرف کننده دارو به وسیله فیدینگ تیوب خوراند شد. به موش های گروه کنترل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی با همین روش خوراند شد. اقدامات انجام شده بر روی موش ها: میزان آلودگی موش ها به وسیله دو پارامتر اصلی میزان مرگومیر و شمارش تعداد کلنی های (CFU) حاصل از کشت بافت کلیه سنجیده شد.

پارامترهای مهم دیگری همچون تعداد ماکروفاژهای صفائی و کشت خون نیز



بررسی شدند. جدا کردن ماکروفاژهای صفائی برای شمارش آن ها به وسیله تزریق ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی سرد (در دو مرحله و هر بار ۵ میلی لیتر) انجام گرفت. برای مقایسه گروه کنترل و مصرف کننده دارو در تعداد ماکروفاژهای صفائی و تست های کشت کلیه، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون تی انجام گرفته و برای بررسی تحرک و مرگومیر موش ها از آزمون مربع کای بهره گیری شد. در هر دو تست مقادیر  $P \text{value} \leq 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها:

نمودارهای شبه سه فازی: شکل ۱ شمایی از نمودارهای شبه سه فازی را برای سیستم های مورد مطالعه در سه نسبت جرمی مختلف سورفکتانت به کوسورفکتانت (تویین ۸۰/عسل) نمایش می دهد.

شکل ۱- نمودار شبه سه فازی در فرمولاسیون های مختلف تعیین مشخصات نمونه های میکرومولسیون: درصد اجزای تشکیل دهنده نمونه های میکرومولسیون حاوی حداکثر روغن در هر یک از سه نسبت سورفکتانتی بررسی شده در جدول یک و نتایج مربوط به آنالیزهای انجام گرفته روی آن ها در جداول ۲ و ۳ بیان شده است. همچنین نمونه ای از آنالیز اندازه ذرات DLS برای دو نسبت سورفکتانتی پایدارتر در لحظه ساخت و پس از دو ماه نیز در شکل ۲ و ۳ آورده شده است.

ظاهری نمونه بررسی شد. به این ترتیب با ثابت نگه داشتن دو جزء، درصد جزء سوم از صفر تا مقادیر بالاتر تغییر یافته و نمونه های متعددی از میکرومولسیون ساخته شد. نمونه های شفاف به عنوان میکرومولسیون و نمونه های کدر در قالب ماکرومولسیون دسته بندی شدند (۱۶،۱۷). هنگام تیتراژ کردن نمونه ها، حجم آب مقطر دیونیزه در لحظه شفاف شدن نمونه ثبت شده و نقاط مرزی ناحیه پایدار میکرومولسیون در نمودار شبه سه فازی با اتصال به هم مشخص شد.

**تعیین میانگین اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص توزیع اندازه ذرات:** تعیین اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص توزیع اندازه ذرات توسط دستگاه زتا سایزر Nano zeta sizer, Malvern Instruments, UK انجام گرفت. به این منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه میکرومولسیون با ۹۸۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط شد.

**تست شاخص شکست نور:** شاخص شکست نور تمامی نمونه ها توسط دستگاه رفرکتومتر Abbe's refractometer (Bellingham + Stanley limited, England) اندازه گیری شد. برای تعیین این شاخص، میزان خطای دستگاه با اندازه گیری شاخص شکست نور آب مقطر و مقایسه آن با مقدار شاخص آب مقطر در دمای اتاق (۱/۳۳۳۳) تعیین شد.

**تعیین ضریب هدایت الکتریکی:** مقدار این ضریب برای تمامی نمونه های میکرومولسیون به وسیله دستگاه هدایتسنج (AZ 86503, Taiwan) اندازه گیری شد.

**تعیین pH:** مقدار pH نمونه های میکرومولسیون توسط دستگاه pH متر (Ciba corning diagnostics limited Sudbury, Suffolk co106xd, England) اندازه گیری شد.

**تعیین میزان پایداری نمونه های میکرومولسیون:** نمونه های میکرومولسیون پس از ساخته شدن، برای بررسی پایداری فیزیکی، به مدت ۱۵ دقیقه تحت فرآیند سانتیفریوژ با سرعت ۱۰ هزار دور در دقیقه قرار گرفتند (۱۶،۱۷). هر گونه تغییر وضعیت نمونه اعم از جدایش فازی، کدورت، کرمی شدن، کلوخه شدن یا ایجاد حالت ژلاتینی به معنای عدم پایداری فیزیکی مناسب به شمار می رود. همچنین پایداری نمونه های میکرومولسیون با گذشت زمان در مقابل کدورت و جدایش فازی تا مدت دو ماه بررسی شد.

**بررسی کارایی درون تن نمونه میکرومولسیون در تست حیوانی:** بررسی کارایی درون تن نمونه میکرومولسیون تهیه شده در کاهش میزان آلودگی قارچی در موش های Balb/C مبتلا به سپسیس از طریق مصرف خوراکی میکرومولسیون انجام گرفته است.

**حیوانات آزمایشگاهی:** ۱۲ رأس موش مدل Balb/C ماده با سن ۶-۸ هفته به دو گروه کنترل و مصرف کننده دارو دسته بندی شدند. میانگین وزنی موش ها در

درصد آب	درصد تویین ۸۰	درصد عسل	درصد روغن	نسبت روغن به فاز سورفکتانتی	نسبت تویین ۸۰ به عسل	شماره نمونه
۵۴	۳/۲	۱۳/۵	۵/۵	۱۲:۸۸	۲:۱	۱
۵۷/۹	۳/۰۶	۷/۲۴	۵/۹	۱۴:۸۶	۴:۱	۲
۵۸/۹	۲/۹۵	۵/۹	۵/۷۵	۱۴:۸۶	۵:۱	۳

جدول ۱- درصد جرمی اجزای تشکیل دهنده نمونه های میکرومولسیون حاوی حداکثر روغن کنجد

#### بحث:

بررسی پایداری فیزیکی نمونه ها نشان داد که هیچ گونه جدایش فازی، کرمی یا ژله ای شدن پس از انجام سانتیفریوژ در آن ها رخ نداده و تمامی نمونه ها از پایداری فیزیکی بسیار بالایی برخوردار بودند. مقدار شاخص توزیع اندازه ذرات برای تمامی نمونه ها کمتر از ۰/۵ بوده است. این نتیجه نشانگر توزیع اندازه ذرات به نسبت یکنواخت است. اندازه ذرات در نمونه های تهیه شده با نسبت های ۴:۱ و ۵:۱

هر دو گروه حدود ۲۸/۵ گرم و تعداد آن ها در هر گروه ۶ رأس بود. مخمر کاندیدا البیکنس سوس ۴ از مرکز پژوهش های علمی-صنعتی ایران تهیه شده و برای افزایش بیماری زایی مخمرها، تعداد دو میلیون مخمر از راه ورید دمی به یک موش Balb/C ماده تزریق شد. قارچ ها معمولاً در کلیه تجمع یافته (۱۸) و مرگ موش ها معمولاً به علت نقص کلیوی است. اما قارچ ها در طحال، کبد، قلب، ریه ها و اعصاب مرکزی نیز مشاهده می شوند (۱۹). پس از گذشت یک ساعت از

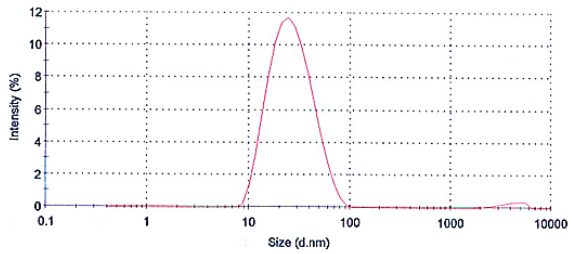
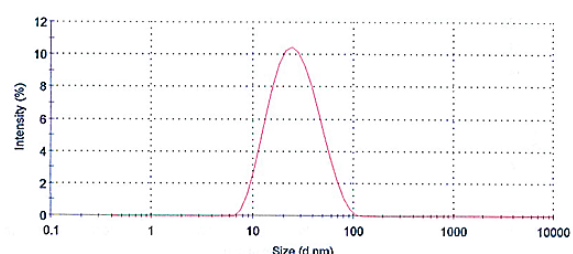
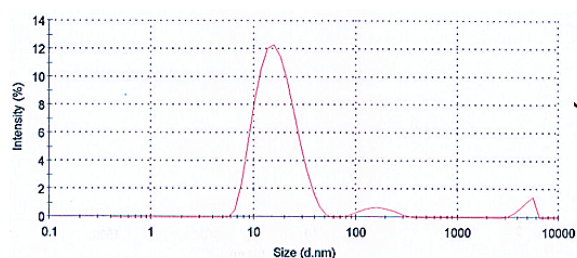
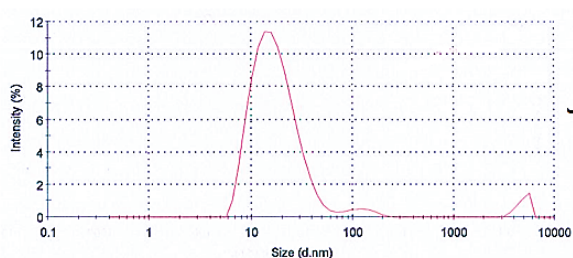


جدول ۲- مشخصات نمونه‌های میکرومولسیون حاوی حداکثر روغن کنجد پس از ساخت

شماره نمونه	میانگین اندازه ذرات نانومتر	پتانسیل زتا (میلیولت)	شاخص توزیع اندازه ذرات	شاخص شکست نور	هدایت الکتریکی (میکروزیمنس)	pH	جدایش فازی در اثر سانتریفیوژ
۱	24/09 ± 2	-14/4 ± 1	0/322	1/3967	249	5/91	مشاهده نشد
۲	17/09 ± 2	-12/6 ± 1	0/284	1/3979	253	5/99	مشاهده نشد
۳	16/62 ± 2	-10/3 ± 1	0/292	1/4008	279	6/07	مشاهده نشد

جدول ۳- اندازه ذرات و پایداری نمونه‌های میکرومولسیون حاوی حداکثر روغن کنجد پس از دو ماه

شماره نمونه	میانگین اندازه ذرات نانومتر	پتانسیل زتا میلی ولت	شاخص توزیع اندازه ذرات	ناپایداری تادوماه
۱	-	-	-	شیربرنگ شد
۲	22/62 ± 2	-16/5 ± 1	0/204	مشاهده نشد
۳	22/36 ± 2	-10/3 ± 1	0/199	مشاهده نشد

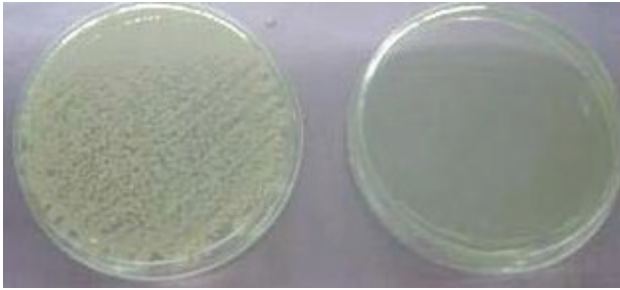


نمودار ۳ - اندازه ذرات میکرومولسیون حاوی حداکثر روغن کنجد با نسبت سورفکتانتی ۵:۱ (الف) پس از ساخت (ب) پس از دو ماه

نمودار ۲- اندازه ذرات میکرومولسیون حاوی حداکثر روغن کنجد با نسبت سورفکتانتی ۴:۱ (الف) پس از ساخت (ب) پس از دو ماه

ساختار این گروه‌های عاملی در ایجاد بار منفی سطح ذرات میکرومولسیون‌های تأثیرگذار بوده است. مقادیر بالای پتانسیل زتا نشانگر شکل‌گیری میکرومولسیون در ساختار مایسل مستقیم (روغن در آب) و مقادیر پایین آن حاکی از شکل‌گیری میکرومولسیون در ساختار مایسل معکوس (آب در روغن) است (۱۶). بر اساس نتایج مقادیر به نسبت بالای پتانسیل زتا حاکی از شکل‌گیری میکرومولسیون روغن در آب است. شاخص شکست نور مبین میزان شفافیت نمونه‌ها بوده و در تشخیص فاز پیوسته میکرومولسیون نیز عامل مهمی به شمار می‌رود. به نحوی که شاخص شکست نور هر نمونه میکرومولسیون به شاخص فاز پیوسته خود نزدیک تر است. مقدار شاخص شکست نور در تمامی نمونه‌ها به عدد ۱/۳۵۸۳، به عنوان عدد شاخص شکست نور آب مقطر در دمای اتاق (با احتساب خطای دستگاه)، نزدیک بوده است. بر این اساس تمامی نمونه‌ها از شفافیت بالایی

کوچک‌تر از اندازه ذرات در نسبت ۲:۱، است. نمودار اندازه ذرات نمونه‌های ۵:۱ و ۴:۱ (شکل ۲) بر خلاف نمونه ۲:۱ که پس از گذشت دو ماه شیری رنگ شد، به رغم افزایش اندک اندازه ذرات، با کاهش شاخص توزیع اندازه ذرات و یکنواختی بیشتر به سمت تک‌پیک شدن پیش رفت. بنابراین نمونه تهیه شده با نسبت سورفکتانتی ۴:۱ و درصد روغن ۵/۹، با پایداری مناسب و درصد روغن بالاتر برای انجام تست حیوانی انتخاب شد. پتانسیل زتا به عنوان معیاری از بار سطحی ذرات شناخته شده، به گونه‌ای که حضور سورفکتانت‌های غیر یونی و آنیونی بار سطح ذرات را در نمونه منفی و وجود سورفکتانت‌های کاتیونی آن را مثبت می‌نماید. حضور گروه‌های عاملی هیدروکسیل و کربوکسیل در ساختار اجزای سازنده نیز موجب ایجاد بار منفی در سطح ذرات می‌شود. بنابراین حضور سورفکتانت‌های غیر یونی توپین ۸۰ با گروه‌های عاملی هیدروکسیل و الکترون‌گاتیویته بالای اتم اکسیژن در



شکل ۴- بررسی آلودگی در کشت خون

در این تحقیق میکروامولسیون حاوی روغن کنجد و عسل به عنوان یک ترکیب گیاهی نانوساختار به عنوان یک ایمونومولتور در درمان سپسیس تهیه شد. در این راستا سورفکتانت توپین ۸۰ در کنار کوسورفکتانت عسل فاز سورفکتانتی را تشکیل داده و پس از رسم نمودارهای شبه سه فازی در نسبت‌های سورفکتانتی مناسب و تعیین خصوصیات فیزیکی-شیمیایی نمونه‌های میکروامولسیون، اثرگذاری نمونه منتخب در محیط درون تن بررسی شد. تمامی نتایج حاکی از شکل‌گیری موفق میکروامولسیون روغن در آب بوده و نتایج اندازه ذرات، میانگین اندازه نانومتری با توزیع یکنواخت و در واقع شرایط مناسب برای جذب و اثربخشی مطلوب درمانی را نشان داد. بررسی کارایی نمونه میکروامولسیون با حداکثر میزان روغن کنجد و پایداری بالا در تست‌های حیوانی نشانگر کاهش آلودگی قارچی در کشت خون و افزایش ماکروفاژهای صفافی در گروه مصرف‌کننده دارو است. از آنجا که تعداد ماکروفاژهای صفافی در گروه مصرف‌کننده میکروامولسیون روغن کنجد-عسل بالاتر بود شاید افزایش دادن سلول‌های ایمنی فاگوسیت‌کننده که می‌توانند سبب کاهش کاندیدها از خون و کلیه شده و به این ترتیب باعث افزایش طول عمر موش‌ها در گروه دریافت‌کننده ترکیب میکروامولسیون شود، یکی از مکانیسم‌های اثر مثبت دارو در روند درمان بیماری محسوب می‌شود. در مجموع، اثربخشی بالای ضدقارچی مشاهده شده در این مطالعه، می‌تواند پشتوانه خوبی برای مطالعه‌های حیوانی و انسانی در آینده باشد

برخوردار بودند. علاوه بر این نزدیک بودن مقدار شاخص شکست نور نمونه‌ها به شاخص آب، می‌تواند مبین شکل‌گیری میکروامولسیون روغن در آب و وجود فاز پیوسته آبی در آن‌ها باشد. میزان هدایت الکتریکی میکروامولسیون‌ها به میزان رسانش فاز پیوسته آن‌ها نزدیک تر است. به طور کلی امولسیون‌های روغن در آب رسانش الکتریکی قابل توجهی داشته و امولسیون‌های آب در روغن فاقد هدایت الکتریکی بالا هستند. بنابراین ضریب هدایت الکتریکی در تشخیص فاز پیوسته میکروامولسیون بسیار اهمیت دارد (۲۰). طبق نتایج، محدوده ضریب هدایت الکتریکی نمونه‌های میکروامولسیون نزدیک به ضریب هدایت الکتریکی آب مقطر است. بنابراین میکروامولسیون‌های تشکیل شده دارای فاز پیوسته آبی و از نوع روغن در آب هستند.

**یافته‌های مربوط به بررسی حیوانی نمونه‌های میکروامولسیون:** روز اول پس از آلودگی سه موش از گروه کنترل مردند و بقیه موش‌های گروه کنترل و تمام موش‌های گروه مصرف‌کننده دارو تا مدت شش روز بعد از آلودگی زنده بودند ( $P=0.045$ ). در گروه کنترل موش‌هایی که روز اول بعد از تزریق مردند، دارای کشت مثبت بوده و در تمام رقت‌ها کلنی مخمر رشد کرده بود. پس از شش روز در بقیه موش‌های گروه کنترل و موش‌های گروه مصرف‌کننده دارو در هیچ رقتی، کلنی تشکیل نشده بود. برای سنجش مقدار کاندیدهای موجود در خون، لگاریتم تعداد کلنی‌های تشکیل شده به مقدار  $6 \times$  میکرولیتر خون کشت داده شده تقسیم شد. تعداد کلنی‌های رشد یافته در گروه کنترل در تمام رقت‌ها بیشتر از گروه مصرف‌کننده دارو بود. لگاریتم تعداد کلنی در گروه کنترل  $2 \pm 5$  و در گروه مصرف‌کننده دارو  $1 \pm 2/0$  به دست آمد که این اختلاف از نظر آماری معنادار است ( $P=0.037$ ). در واقع این فرآورده موجب کاهش تراکم میکروبی کلیه شده است. روش دیگر بررسی آلودگی کشت خون، مشاهده ماکروسکوپی لوله‌های حاوی کشت است. در این روش ایجاد رنگ زرد و وجود کدورت نشان‌دهنده آلودگی به قارچ‌ها است (شکل ۴). میانگین تعداد ماکروفاژهای صفافی در گروه کنترل حدود  $3.1 \pm 7.8$  میلیون به ازای هر موش و در گروه مصرف‌کننده دارو  $3.8 \pm 15.1$  میلیون به ازای هر موش بود ( $P=0.043$ ).

**منابع:**

1. Pfaller, M., et al., National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 1998. 31(1): p. 327-332.
2. Olila, D. and J. Opuda-Asibo, Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Zanthoxylum chalybeum* and *Warburgia ugandensis*, Ugandan medicinal plants. *African Health Sciences*, 2001. 1(2): p. 66-72.
3. Kalechman, Y., et al., Anti-IL-10 therapeutic= strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *The Journal of Immunology*, 2002. 169(1): p. 384-392.
4. Den Bout-van den Beukel, V., et al., Evaluation of cytotoxic, genotoxic and CYP450 enzymatic competition effects of Tanzanian plant extracts traditionally used for treatment of fungal infections. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2008. 102(6): p. 515-526.
5. Akagawa, G., et al., Protection of C3H/HE J e from Development of *Candida Albicans* Infection by Oral Administration of Juzen-Taiho-To and its Component, Ginseng Radix: Possible Roles of Macrophages in Tee Bost Defense Mechanisms. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 1996. 18(1): p. 73-89.
6. Srinivasan, P. and M.Y. Liu, Comparative potential therapeutic effect

- of sesame oil and peanut oil against acute monocrotaline (Crotalaria) poisoning in a rat model. *Journal of Veterinary Internal M*
7. Chen, H., et al., A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *Journal of controlled release*, 2004. 98(3): p. 427-436.
8. Narang, A.S., D. Delmarre, and D. Gao, Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International journal of Pharmaceutics*, 2007. 345(1): p. 9-25.
9. Sikarra, D., et al., Techniques for solubility enhancement of poorly soluble drugs: an overview. *JMPAS*, 2012. 1: p. 1-22.
10. Dizaj, S.M., Preparation and study of vitamin A palmitate microemulsion drug delivery system and investigation of co-surfactant effect. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 2013. 3(1): p. 1-6.
11. Karasulu, H.Y., Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. *Expert opinion on drug delivery*, 2008. 5(1): p. 119-135.
12. Küçük, M., et al., Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 2007. 100(2): p. 526-534.
13. Mandal, M.D. and S. Mandal, Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2011. 1(2): p. 154-160.

14. Gharaei M. et al. Paper prepared pumpkin seed oil microemulsion (Cucurbita pepo) as a vehicle for oral drug delivery. *Journal of Medicinal Plants*, 2008,8(2): p. 53-44
15. Chaudhary, A., et al., Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. *J Adv Pharm Educ Res*, 2012. 2(1): p. 32-67.
16. Moghimipour, E., A. Salimi, and S. Eftekhari, Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. *Adv Pharm Bull*, 2013. 3(1): p. 63-71.
17. Waman, N., et al. Development and validation of UV spectroscopic method for estimation of metaxalone in bulk and microemulsion at different physiology Ph. *Indoamerican journal of pharmaceutical Research*, 2014. 4(1): p. 101-6.
18. Evans, Z.A. and D. Mardon, Organ localization in mice challenged with a typical *Candida albicans* strain and a pseudohyphal variant. *Experimental Biology and Medicine*, 1977. 155(2): p. 234-238.
19. Green, C.B., X. Zhao, and L.L. Hoyer, Use of green fluorescent protein and reverse transcription-PCR to monitor *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression in a murine model of disseminated candidiasis. *Infection and immunity*, 2005. 73(3): p. 1852-1855.
20. Atashafrooz, Z., S. Maleki Dizaj, and A. Salehi Sadaghiani, Cucurbita pepo oil as a drug microemulsion formulation: study of phase diagram. *Nanomedicine Journal*, 2014. 1(5): p. 298-301.