دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

مقایسه اثرات ضد قارچی نانو ذرات نقره با داروی فلوکونازول بر آسپرژیلوس فومیگاتوس

نوشین نقش
استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان،اصفهان، ایران

منیر دودی
استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

زینب صفایی نژاد
دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

نویسنده مسئول: زینب صفایی نژاد
تلفن: ۰۹۱۳۸۲۰٤۷۷۹

پست الکترونیک:safayinejad@yahoo.com

دریافت مقاله:۹۰/۱۱/۱
ویرایش نهایی:۹۱/۱۱/٤
پذیرش:۹۱/۱۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *در سال‌های اخیر مقاومت سویه‌های قارچی فرصت طلب بر علیه عوامل ضد قارچی متداول ایجاد شده اند و همچنین عوارض جانبی جدی که این ترکیبات بر روی سلول های پستانداران دارند نظر محققین را برای جست و جوی ترکیبات ضد قارچی جدید بر انگیخته است. در این بررسی اثرات ضد قارچی نانو ذره نقره بر قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس مورد بررسی قرار گرفت .*

روش بررسی: *به منظور بررسی اثرات ضد قارچی نانو ذره نقره به قطر ۱۰ nm و به شکل کروی بر روی قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس میانگین قطر رشد کلنی پس از ۸ روز و تعداد کلنی ها در روزهای مختلف از روش قطره مستقیم استفاده گردید. در ادامه به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کننده ی رشد قارچ (MIC) و حداقل غلظت کشنده قارچ(MFC) نانو ذرات نقره و فلوکونازول تکنیک روش رقت سازی سریال در چاهک انجام شد. در پایان میزان MIC و MFC نانوذرات نقره با میزان MIC و MFCفلوکونازول مقایسه شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از روش قطره مستقیم نشان داد که نانو ذره نقره در یک الگوی وابسته به دوز موجب کاهش قطر کلنی‌های قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌گردد. نتایج حاصل از تأثیر نانو ذرات بر روی تعداد کلنی‌ها در روزهای مختلف نشان داد که تعداد کلنی‌ها تا روز ششم افزایش یافته و سپس ثابت گردید. نتایج حاصل از تست روش رقت سازی سریال در چاهک نشان داد که میزان MIC و MFC نانوذرات نقره به ترتیب ppm ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ ppm می‌باشد.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان می‌دهد که نانو ذره نقره با قطر ۱۰nmدارای فعالیت آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد .*

واژه های کلیدی: *نانو ذرات نقره، آسپرژیلوس فومیگاتوس، فعالیت ضد قارچی*

آدرس‌مقاله:
نقش ن، دودی م، صفایی نژاد ز" مقایسه اثرات ضد قارچی نانو ذرات نقره با داروی فلوکونازول بر آسپرژیلوس فومیگاتوس".مجله علوم آزمایشگاهی تابستان ،۱۳۹۲ دوره هفتم (شماره۲):۱۲-۷

مقدمه

عفونت های قارچی ناشی از قارچ های فرصت طلب از جمله عفونت هایی هستند که امروزه در جوامع انسانی شیوع یافته اند. مطالعات نشان می دهند که برخی از افراد که دارای ضعف سیستم ایمنی هستند، بیشتر در معرض ابتلا به این عفونت ها می باشند(۲،۱). آسپرژیلوس فومیگاتوس یکی از انواع پاتوژن های فرصت طلب است. اسپورهای استنشاق شده این قارچ معمولاً در حفراتی که بر اثر بیماری های ریوی در ریه ایجاد شده اند مستقر می شوند. این قارچ توده هایی ازفیبرهای درهم را در این حفرات تشکیل می دهد که نه تنها موجب لخته شدن خون می گردد بلکه به تدریج بزرگتر شده و منجر به تخریب بافت ریه می شود. آسپرژیلوزیس ریوی، آسپرژیلوزیس جلدی، آسپرژیلوزیس یاتروژنیک ، آسپرژیلوزیس منتشر، آسپرژیلوزیس سیستم اعصاب مرکزی و اتو میکوز باشند(۳). امروزه پژوهشگران به دنبال بررسی عوامل ضد قارچی جدید می باشند. مقاومت ایجاد شده بر علیه داروهای ضد قارچی از نظر اهمیت هم سطح با مقاومت ایجاد شده برعلیه عوامل ضد باکتریایی نیست شایددلیل اصلی این امر را بتوان به محدود بودن تعداد عوامل ضد قارچی موجود که خود نیز به دلیل یوکاریوت بودن قارچ ها است نسبت داد. امروزه مصرف ترکیبات ضد قارچی به علت دارا بودن عوارض جانبی وسیع به میزان زیادی محدود شده است. سمیت و مقاومت دارویی، دلایل اصلی تحقیقات وسیع روی ترکیبات ضد قارچی جدید و بررسی اثرات درمانی آنهاست (۱۲).در این میان نانو ذرات از جایگاه ویژه¬ای بر خور دارند. نانوذرات به دسته ای از اتم هایی که دارای ابعادی بین ۱تا ۱۰۰ نانو متر هستند اطلاق می شوند. از میان نانو ذرات فلزی، نانو ذرات نقره به علت خواص فیزیکوشیمیایی جالب، نظر بسیاری از محققین را به خود جلب نموده اند(۵). نقره در مقایسه با سایر فلزات در عین اینکه از سمیت بالایی برعلیه میکرو ارگانیسم ها برخوردار است دارای سمیت کمی برای سلول های پستانداران می باشد(۶). با توجه به مطالعات گذشته بررسی اثرات ضد¬قارچی نانو ذره نقره با قطر ۱۰nm و به شکل کروی بر علیه قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس مورد ارزیابی قرارگرفت.

روش بررسی

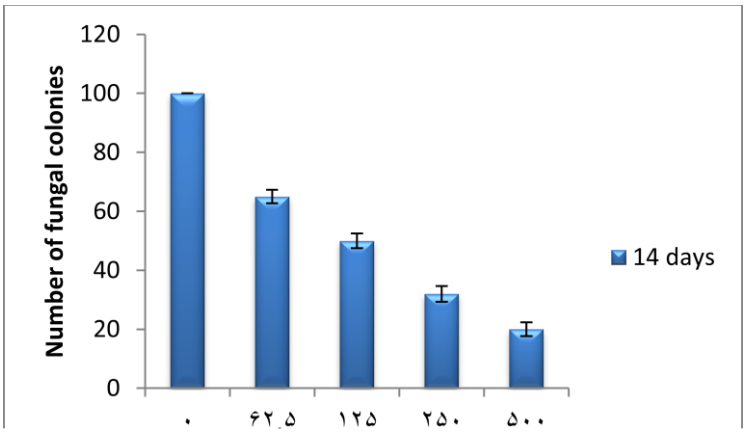
ابتدا سویه استاندارد آسپرژیلوس فومیگاتوس (به شماره PTCC:5009) از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی تهران تهیه شد و در محیط های کشت پتیتو دکستروز آگار و پتیتو دکستروز براث (Merck; Germany)کشت داده شد. جهت تهیه سوسپانسیون قارچی در شرایط عاری از میکروب یک لوپ کلنی از محیط کشت قارچ را برداشته و به یک میلی لیتر آب دو بار تقطیر اضافه گردید. از محلول یکنواخت شده ۱۰ میکرولیتر روی لام نئوبار تزریق و با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ تعداد اسپورها شمارش -شدند، در ادامه ۱۰ میکرولیتر از محلول اسپور شمارش شده به طور میا نگین معادل ۱۰۰ عدد به صورت چمنی بر روی محیط کشت، کشت داده ¬شد. در این مطالعه از نانو ذره نقره با قطر ۱۰ نانومتر و به شکل کروی که توسط شرکت زیست آزمای رشد تهران طراحی و سنتز شده بود، استفاده شد. این نانو ذرات به صورت محلول در غلظت ۵۰۰ppmبودند که برای تهیه رقت¬های مورد نیاز (۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ppm) از آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. جهت بررسی اثرات ضد قارچی نانوذره نقره حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد قارچ (Minimum Inhibitory Concentration MIC) و غلظت کشنده قارچ(Minimum Fungicide Concentration=MFC) به روش رقت سازی سریال در چاهک مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت:ابتدا از محیط کشت پتیتو دکستروز برات ۱۰۰ میکرو لیتر داخل یک ردیف از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. در ادامه به اولین چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از نانو ذره نقره با غلظت ۵۰۰ppm اضافه شد. از چاهک اول ۱۰۰ میکرو لیتر محلول برداشه شد و به چاهک بعدی اضافه شد. این روند از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک

دوازدهم انجام شد تا تمامی غلظت های مورد نظر ساخته شوند.در ردیف دیگر پس از اضافه نمودن ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت، به اولین چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر داروی ضد قارچی فلوکونازول با غلظت ppm ۷۵۰۰ به عنوان شاهد اضافه شد و مطابق روش بالا رقیق گردید. به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون قارچی اضافه شد. پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند سپس چاهک ها از نظر کدورت ناشی از رشد قارچ تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند و آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی قابل تشخیص نبود (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. در پایان از تمامی چاهک-هایی که در آنها عدم رشد قارچ مشاهده شده بود به میزان ۱۰ میکرو لیتر برداشته شد و درون ظروف پتری دیش حاوی محیط کشت قارچ کشت داده شد. تمامی نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد، و ظرف پتری که حاوی کمترین غلظت نانو ذره بود و در نتیجه در آن عدم رشد قارچ قابل مشاهده بود به عنوان MFC در نظر گرفته شد(۷).پس از کشت قارچ در محیط کشت ، از تمامی غلظت‌های مورد نظر به میزان یک میلی لیتر برداشته شد و به صورت صورت قطره مستقیم به یک نقطه در سطح محیط کشت اضافه گردید. سپس درب ظروف پتری را بسته و آنها را به آرامی حرکت می دهیم تا محلول نانو ذره در تمام محیط پخش شود. پس از این که این قطرات جذب محیط شدند، ظروف پتری به مدت ۲ تا ۱۴ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و در پایان نتایج ثبت گردیدند (۸) . به منظور مقایسه قطر و تعداد کلنی ها در گروه های شاهد و تیمار از آزمون آماری ANOVAاستفاده شد و هر آزمایش حداقل ۴ بار تکرار شد.

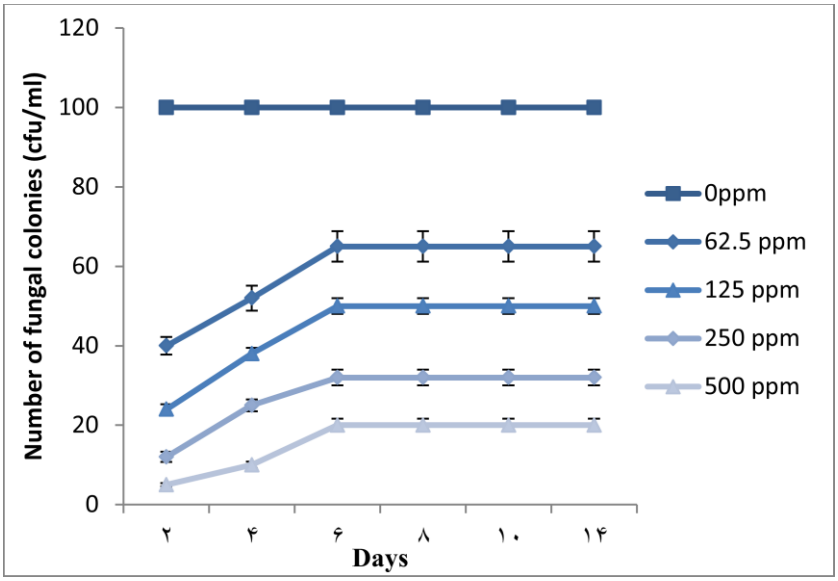
یافته ها

نتایج حاصل از بررسی اثر نانو ذره نقره با غلظت های ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰ و ppm۵۰۰ بر روی قطر و تعداد کلنی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بر پایه روش قطره مستقیم در نـمودارهای ۱ و ۲ ارائه شده است. تمـامی داده هـا به خوبی نمایان‌گر این واقعیت هستند که یک رابطه خطی معکوس و معنی دار ($p<0.001$) بین افزایش غلظت نانو ذرات نقره و تعداد کلنی‌ها و قطر کلنی قارچ مذکور وجود دارد. به عبارت دیگر می‌توان گفت اثرات وابسته به دوز (Dose dependent) می‌باشند. نتایج حاصل از اثرات نانو ذره نقره در غلظت های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰و ppm۵۰۰ در روزهای مختلف بر روی تعداد کلنی های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (نمودار ۲) نشان دادند که در تمامی غلظت ها تعداد کلنی ها تا روز ششم افزایش یافت اما از روز ششم تا روز چهاردهم در هیچ یک از غلظت ها تغییری در تعداد کلنی‌ها دیده نشد. همچنین نتایج مربوط به تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) نانو ذره نقره همسو با نتایج قبلی بود، به گونه ای که میزان MICو MFC به ترتیب ۳۱/۲۵ و ppm۶۲/۵ برآورد گردید. این در صورتی است که میزان MIC فلوکونازول ppm۳۷۵۰ و میزان MFC آن ppm۷۵۰۰ بدست آمد.امروزه مصرف ترکیبات ضدقارچی به علت دارا بودن عوارض جانبی وسیع به میزان زیادی محدود شده است. تب، رعشه، حالت تهوع و اختلال در عملکرد کلیه از جمله علائمی هستند که در برخی موارد با مصرف آمفوتریسین B بوجود می‌آیند. خانواده آزولها مانند فلوکونازول علاوه بر این که موجب توقف سنتز درگسترول می گردند دارای سمیت کبدی نیز هستند(۹). با در نظر گرفتن این مشکلات شناسایی و توسعه عوامل ضد قارچی جدید که دارای کمترین سمیت برای سلول های میزبان باشند ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه فعالیت ضد قارچی نانو ذره نقره با قطر nm۱۰ و به شکل کروی بر علیه قارچ فرصت طلب *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مورد بررسی قرار گرفت نتایج حاصل از روش های براث میکرودایلوشن و قطره مستقیم نشان دادند که فعالیت ضد قارچی این نانو ذره وابسته به دوز می باشد. از

طرف دیگر بر اساس نتایج حاصل از شمارش تعداد کلنی های قارچ درغلظت ها و روزهای مختلف با استفاده از روش قطره مستقیم به نظر می رسد این نانو ذره در تمامی غلظت‌های مورد استفاده تا روز ششم تیمار فعالیت ضد-قارچی ندارد اما پس از روز ششم تعداد کلنی‌های شمارش شده در تمامی غلظت‌ها ثابت باقی ماند. این در حالی است که نصر اللهی و همکاران در سال ۲۰۱۱ پس از سنتز نانو ذرات نقره، فعالیت ضد قارچی آن را بر علیه دو نوع قارچ *Candida albicans* و *Saccharomyce scerevisiae* مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که نانو ذرات نقره دارای فعالیت ضد قارچی قابل توجهی بر علیه هر دو سویه مورد آزمایش بودند، میزان MIC نانو ذرات نقره بر علیه هر دو نوع قارچ نامبرده به صورت چشمگیری کمتر از میزان MICآمفوتریسین B و فلوکونازول بود ، آنها بیان کردند که نانو ذرات نقره از طریق ایجاد اختلال در پتانسیل غشایی قارچ های مذکور فعالیت ضد قارچی خود را اعمال می‌کند، همچنین آنالیزهایی که توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفته بود نشان داد که تشکیل حفراتی در غشاء سیتوپلاسمی قارچ ها سبب مرگ سلولی می‌شود(۷). Martinez-Gutierrez و همکاران در سال ۲۰۱۰ پس از



نمودار ۱-مقایسه اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره نقره با قطر ۱۰nm بر قطر کلنی های قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس با استفاده از روش قطره مستقیم (Mean±S.E.M, P<0.001)



نمودار ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره نقره با قطر ۱۰nm بر روی تعداد کلنی‌های قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس در مدت زمان‌های مختلف بر اساس روش قطره

ساخت ۱۵ نوع از نانو ذرات نقره و نانو ذرات TIO_2 و ترکیبی از این دو ، فعالیت ضد میکروبی آنها را بر علیه سویه های باکتریایی و قارچی فرصت طلب و پاتوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که نانو ذرات نقره در ابعاد ۲۰-۲۵ نانومتر بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را بین سایر نانو ذرات ساختگی دارا می باشند. هر یک از نانو ذرات نقره و نانو ذرات TIO_2 به تنهایی فعالیت ضد قارچی کمی داشتند اما زمانی که در طی دوره سنتز با یکدیگر ترکیب شدند فعالیت ضد قارچی آنها افزایش یافت(۱۰). Kim و همکاران در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضد قارچی نانو ذرات نقره را بر علیه قارچ *C. albicans* گزارش نمودند و نشان دادند که نانو ذرات نقره از طریق ایجاد اختلال در ساختار غشاء قارچ اثرات ضد قارچی خود را اعمال می کنند(۱۳). Falkiewicz-Dulikr و همکاران در سال ۲۰۰۸ که به دنبال بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره به منظور استفاده از این نانو ذرات در مواد سازنده کفش بودند گزارش نمودند که محلول ۱٪ این نانو ذره قادر به مهار رشد اکثر سویه های قارچی شبه مخمر و انواع کپک ها می‌باشد. آنها همچنین بیان داشتند که نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ppm رشد انواع باکتری ها را مهار می کند اما فعالیت آن بر علیه درماتوفیت ها و کپک ها کمتر بود(۱۲). Kim و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش نمودند که فعالیت ضد قارچی نانو ذرات نقره به شکل کروی بر علیه درماتوفیتی بنام*Trichophyton mentagrophytes* و قارچ *Trichosporon beigelii* در مقایسه با عوامل ضد قارچی موجود مانند فلوکونازول و آمفوتریسین B بیشتر است(۱۳). این در حالی است که در مطالعه حاضر اثر نانوذرات نقره ۱۰ نانومتری به شکل کروی بیشتر ازفلوکلونازول بود این تفاوت ممکن است به دلیل قطر نانوذرات باشد. براساس پژوهش های محققین تغییرات ایجاد شده در قطر، شکل و غلظت نانو ذرات می تواند باعث بروز نتایج متفاوت در فعالیت ضد قارچی این ذرات می گردند(۱۷و۱،۴). Gajbhiye و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که نانو ذرات نقره فعالیت ضد قارچی فلوکونازول را بر علیه قارچ‌هایی مانند: *Trichoderma sp*،*Phomaglomerata* و *Candida albicans* را افزایش می دهد و حداکثر این فعالیت بر علیه *Candida albicans* مشاهده شده بود(۱۳).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که نانو ذره نقره با قطر ۱۰nm و به شکل کروی دارای فعالیت ضدقارچی بر علیه قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* می باشد و با در نظر گرفتن این نکته که ترکیبات رایج امروزی که برای درمان انواع عفونت های قارچی تجویز می شوند دارای مشکلاتی مانند سمیت و مقاومت دارویی می باشند لذا امیدواریم که در آینده این نانو ذره پس از آزمایش های Biosafety بر روی حیوانات آزمایشگاهی بتواند برای عفونت های ناشی از قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* پیشنهاد گردد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می دانند از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان – قهدریجان سر کار خانم ها مهندس شادی شاهسار و سمیه پارسافر به خاطر نظرات و راهنمائی های سودمندی که ارائه نمودند، کمال تشکر و قدر دانی را به عمل آورند.

Refrences

1.Silver S. *Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds*. FEMS Microbiol Rev. 2003; 27(2-3): 341–353.

2.Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. Burns. 2000; 26(2): 131–138.

3.Bansod S, Rai M. *Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic Aspergillusfumigatusand A. niger*. World Journal of Medical Sciences. 2008; 3(2): 81-88.

4. Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, et al. *Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on Candida albicans*. Biometals. 2009; 22(2): 235-242.

5.Schultz S, Smith DR, Mock JJ, Schultz DA. *Single-target molecule detection with nonbleachingmulticolor optical immunolabels*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. 2000; 97: 996-1001.

6. Zhao GJ, Stevens SE. *Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion*. Biometals. 1998; 11(1): 27–32.

7. Mahon C R, Manoselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2nd ed. WB. Saunders Company. 2000; 9513-62.

8. Iranbakhsh A, Ebadi M, Bayat M. *The Inhibitory effects of plant methanolic extract of daturastramoniumL. and Leaf explant callus against bacteria and fungi.* Global Veterinaria. 2010; 4(2): 149-155.

9.Nasrollahi A, Pourshamsian KH, Mansourkiaee P. *Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi*. Int J Nano Dim. 2011; 1(3): 233-239.

10. Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Morales Sanchez E, et al. *Synthesis, Characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2010; 6(5): 681-688**.**

11. Kim KJ, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. *Antifungal effectof silver nanoparticles on dermatophytes*. J Microbiol Biotechnol. 2008; 18(8): 1482- 1484.

12. Falkiewicz-Dulik M, Macura AB. *Nanosilver as substance biostabilising footwear materials in the foot mycosis prophylaxis*. Medical Mycology. 2008;15(3): 145–150.

13. Gajbhiye M, Jayendra K, Ingle A, Gade A, Rai M. *Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole*. Nanomedicine. 2009; 5(4): 382-386.