

Comparing the antifungal effects of gold and silver nanoparticles isolated from patients with vulvovaginal candidiasis in-vitro

Rahimzadeh-Torabi L^{1*}, Doudi M¹, Naghsh N², Golshani Z¹

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I. R. Iran.

Received February 6, 2016; Accepted July 13, 2016

Abstract:

Background: In recent years the emergence of resistance to opportunistic fungi (e.g. *Candida albicans*) has dramatically increased worldwide. The toxicity of antibacterial drugs and the occurrence of resistance to fungi and the resultant drug interactions make it necessary to assess new drugs. The aim of this study was to compare the antifungal effects of gold and silver nanoparticles on patients with vulvovaginal candidiasis.

Materials and Methods: In order to identify the samples, the conventional mycological methods (morphology on corn meal/chrome agar and germ tube production) were utilized. To evaluate the antifungal effects of spherical silver and gold nanoparticles the diameter of inhibitory zone was measured using disk diffusion method. In addition, the minimum fungicidal concentration (MIC) and Minimum inhibitory concentration (MFC) of samples were determined by microdilution method.

Results: Among the total identified isolates of *Candida albicans* (*C. albicans*), 58 samples were inhibited using spherical silver and gold nanoparticles with 10 nm diameter. The inhibitory zone diameter was between 0-19 mm. The MIC and MFC for silver and gold nanoparticles were 21.31±11.40; 32.15±25.77 ppm and 16.68±9.37; 7.93±4.72 ppm, respectively.

Conclusion: The results of the present investigation showed that spherical gold and silver nanoparticles with 10 nm diameter have some antifungal effects against the *Candida albicans*. Probably in future the silver and gold nanoparticles have the potential of treating the vulvovaginal candidiasis.

Keywords: Gold Nanoparticles, Silver nanoparticles, Vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*

* Corresponding Author.

Email: negar.rahimz@gmail.com

Tel: 0098 913 561 8257

Fax: 0098 313 742 0136

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2016; Vol. 20, No 4, Pages 331-339

Please cite this article as: Rahimzadeh-Torabi L, Doudi M, Naghsh N, Golshani Z. Comparing the antifungal effects of gold and silver nanoparticles isolated from patients with vulvovaginal candidiasis in-vitro. *Feyz* 2016; 20(4): 331-9.

مقایسه اثرات ضد قارچی نانوذرات طلا و نانوذرات نقره بر کاندیدا/آلبیکنس جدا شده از مبتلایان ولوواژینیت کاندیدایی در شرایط آزمایشگاهی

*^۱، منیر دودی، ^۲، نوشین نقش، ^۳، زینب گلشنی
^۴ لادن رحیم‌زاده ترابی

خلاصه:

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر مقاومت سوش‌های قارچی فرصت طلب از جمله کاندیدا/آلبیکنس به میزان زیادی افزایش یافته است. سمیت داروهای ضد میکروبی، ایجاد مقاومت در قارچ‌ها و تداخل‌های دارویی توجه به بررسی ترکیبات دارویی جدید را خاطر نشان می‌سازد. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات نقره و طلا روی ولوواژینیت کاندیدایی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی به منظور تشخیص نمونه‌ها از روش‌های معمول قارچ شناسی شامل: شکل ظاهری بر محیط کورن میل آگار، و کروم آگار و ایجاد لوله زایا استفاده گردید. جهت بررسی اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره و نانوذرات طلای کروی شکل خریداری شده از شرکت نوترینو تهران، قطر هاله ممانعت از رشد با استفاده از روش انتشار دیسک اندازه‌گیری شد. میزان MIC و MFC ایزوله‌ها با استفاده از روش میکروداپلوشن تعیین گردید.

نتایج: از مجموع ایزوله‌های کاندیدا/آلبیکنس شناسایی شده تعداد ۵۸ نمونه توسط نانوذرات نقره و نانوذرات طلا با قطر ۱۰ نانومتر مهار شدند. قطر هاله ممانعت از رشد بین ۰-۱۹ میلی‌متر به دست آمد. MIC و MFC نانوذرات طلا به ترتیب $7/93 \pm 4/72$ و $9/37 \pm 6/68$ ppm و نانوذره نقره به ترتیب $40/31 \pm 11/40$ و $77/25 \pm 32/15$ ppm به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان دادند که نانوذرات نقره و طلای کروی با قطر ۱۰ نانومتر تا حدودی دارای فعالیت ضد قارچی علیه کاندیدا/آلبیکنس می‌باشند. احتمال دارد در آینده پس از بررسی این نانوذرات بتوان در درمان عوامل مولد ولوواژینیت کاندیدایی از آنها استفاده نمود.

واژگان کلیدی: نانوذرات طلا، نانوذرات نقره، کاندیدیازیس واژن، کاندیدا/آلبیکنس

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۵، صفحات ۳۳۹-۳۳۱

مقدمه

متأسفانه به علت شباهت علائم انواع عفونت‌های واژن باهم و عدم توجه کافی به راه‌های تشخیصی و اختصاصی، اغلب درمان صحیح صورت نگرفته و علائم ادامه می‌یابد که منجر به ناراحتی بیمار می‌شود و در برخی موارد نیز عوارضی مانند بیماری التهابی لگن سروسیست مزمن و آلودگی دستگاه ادراری را در پی دارد [۵، ۶]. کاندیدا/آلبیکنس (*Candida albicans*) مسئول اصلی موارد عفونت‌های قارچی واژن است. برجسته‌ترین علامت کاندیدیاز، خارش واژن است؛ ترشح واژینال می‌تواند از حالت آبکی تا حالت غلیظ یکنواخت متغیر باشد [۷، ۸]. Oriel و همکاران گزارش کرده‌اند که خارش واژینال با یا بدون ترشح در ۵۰ درصد افراد دیده می‌شود؛ در حالی که ترشح فقط در ۳۰ درصد افرادی که کشت مثبت دارند، وجود دارد [۹]. شکایات بالینی ناشی از کاندیدیازیس شامل سرخی و التهاب سرویکس، و ترشح واژینال بوده و گاهی ترشحات سفید بدون بو و تکه تکه در این عفونت مشاهده می‌گردد [۱۰]. در مطالعه خرسندی در سال ۱۳۷۹ در تهران، شایع‌ترین شکایت زنان مبتلا به عفونت مربوط به ترشح، با شیوع ۶۰ درصد هم‌چنین خارش و درد شکمی به ترتیب با شیوع ۴۹ و ۴۳ درصد بود [۱۱، ۱۲]. این بیماری با بیشترین شیوع در زنان سنین ۲۰-۳۰ سال رخ می‌دهد. خوشبختانه تعداد اندکی از بیماران دچار عود بیماری و عفونت مزمن می‌شوند [۱۳]. در انگلستان در سال ۱۹۹۳

امروزه مصرف ترکیبات 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 آنها است. واژینیت شایع‌ترین مشکل بیماری‌های زنان است [۱، ۲]. واژینیت‌ها به‌طور عمده به‌وسیله گونه‌های کاندیدا، باکتری گاردنرلا واژینالیس، و انگل تریکوموناس واژینالیس ایجاد می‌شوند [۳]. بیشتر متخصصین معتقدند که ۹۰ درصد موارد واژینیت، واژینیت کاندیدایی هستند [۴].

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران
^۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران
^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران
^۴ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده علوم پایه

دوره‌نویس: ۰۳۱ ۳۷۴۲۰۱۳۶

تلفن: ۰۹۱۳ ۵۶۱۸۲۵۷

پست الکترونیک: negar.rahimz@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۴/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۷

تهیه لام مستقیم

یک کلونی خالص از قارچ مربوطه انتخاب شده و به کمک رنگ آمیزی لام مستقیم زیر میکروسکوپ مشاهده گردید.

پدیده ایجاد لوله زایا

برای تشخیص گونه *کاندیدا آلبیکنس* پدیده ایجاد لوله زایا بررسی شد. بدین منظور یک کلونی از قارچ با یک سی سی سرم انسانی مخلوط شد و ۴-۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۴-۳ ساعت مقداری از سوسپانسیون را بین لام و لامل قرار داده و زیر میکروسکوپ، ایجاد لوله زایا بررسی شد. *کاندیدا آلبیکنس* در این محیط لوله زایا ایجاد می کند که طول آن ۲/۵ برابر قطر سلول مادر است، درحالی که سایر گونه های *کاندیدا* لوله زایا ایجاد نمی کنند و یا لوله زایای آنها کوتاه است. آزمون فوق برای تأیید نتایج بعد ۷۲ ساعت، ۳ بار تکرار شد (برای این آزمون فوق ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت که در ۲۴ ساعت اولیه کشت قطر هاله عدم رشد بسیار کوچک است). برای ایجاد کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار به منظور تشخیص کلامیدوکونیدی از محیط کورن میل آگار (بیومارک هند) حاوی توئین (۸۰ مرک آلمان) استفاده شد. قسمتی از کلونی به صورت یک خط افقی در محیط کشت تلقیح شد، سپس پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از گذشت زمان، محل تلقیح زیر میکروسکوپ بررسی شد.

کشت در محیط کروم کاندیدا آگار

به منظور تشخیص گونه های *کاندیدا* کشت در محیط کروم آگار کاندیدا (پاریس) انجام شد. یک کلونی از کشت تازه کاندیدا روی محیط کروم آگار کاندیدا به صورت خطی کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از مدت زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت رنگ ایجاد شده کلونی روی محیط کشت بررسی شد. کلونی سبز روشن نشان گر *کاندیدا آلبیکنس* است.

تهیه نمونه از استوک اصلی

از کلیه نمونه های *کاندیدا آلبیکنس* جهت انجام انواع تست های تعیین حساسیت به نانوذرات نقره استفاده شد. بدین منظور، ابتدا در شرایط کاملا استریل از قارچ مورد نظر بر پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه شد. سپس، یک کلونی خالص از قارچ مربوطه انتخاب شده و در یک سی سی سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون قارچی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید.

میزان شیوع کاندیدیازیس واژن به ترتیب ۲۵ و ۲۷ درصد گزارش شده است [۱۴]. در مطالعه Ferris و همکاران در سال ۱۹۹۵ در دانشگاه جورجیا از ۴۹۹ بیمار مبتلا به واژینیت، در ۲۰ درصد موارد کاندیدیازیس تشخیص داده شد [۱۵]. در مجموع ممکن است که علل شکایات واژینال در بررسی میکروسکوپی به راحتی تشخیص داده شوند با افزایش مصرف پیش گیرانه داروهای نظیر فلوکونازول شاهد افزایش گزارش های مربوط به افزایش مقاومت به این داروها در برخی از گونه های *کاندیدا* هستیم [۱۶]. استفاده از نانوذرات می تواند برای درمان عفونت های قارچی نتیجه بخش بوده و این ذرات به خاطر خواص ویژه خود توانسته اند در مقایسه با آنتی بیوتیک ها قدرت مهار بیشتری با غلظت کمتری نسبت به داروها داشته باشند. از مهم ترین خواص بحث برانگیز نانوذرات طلا اندازه بسیار کوچک و در مقابل فضای سطحی بزرگ شان است که باعث افزایش فعالیت های شیمیایی و بیولوژیکی، انحلال پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان، توانایی نفوذ به غشا سلول و خاصیت ضدباکتریایی و آنتی سرطانی آن است. نانوذرات نقره به علت خواص فیزیوشیمیایی جالب نظر بسیاری از محققین را به خود جلب نموده اند [۱۷]. از آنجایی که برخی داروهای رایج ضدقارچی دارای عوارض جانبی متعدد از جمله سرطان و مسمومیت هستند و هم چنین مقاومت دارویی در مصرف آنها ایجاد می شود و از طرفی تأثیرات نانوذرات نقره و طلای کروی شکل با قطر ۱۰ نانومتر تا به حال برای این نوع قارچ بررسی نشده است، لذا این تحقیق به منظور بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات نقره و طلا روی کاندیداهای مولد ولوواژینیت کاندیدیایی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی در شهر اصفهان و در مرداد ۱۳۹۴ و روی ایزوله های جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس به صورت تست پاپ اسمیر در گروه های سنی مختلف صورت گرفت. در این تحقیق از سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC ۱۶۷۷ تهیه شده از مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان استفاده شد.

مراحل تشخیص گونه های کاندیدا

بدین منظور ابتدا در شرایط کاملا استریل از نمونه های قارچی مورد نظر بر پلیت حاوی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (مرک آلمان) کشت تازه تهیه شد و در انکوباتور ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شد.

تهیه غلظت‌های مختلف از نانوذرات طلا و نانوذرات نقره ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول کلوئیدی نانوذرات طلا به صورت محلول کلوئیدی در اندازه ۱۰ نانومتر و غلظت ۱۰۰ ppm به شکل کروی و به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر از شرکت نوترینوی تهران خریداری شده و رقت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ ppm از آن تهیه شد. در این بررسی از نانوذرات نقره کروی شکل با قطر ۱۰ نانومتر و فرمول شیمیایی Ag که توسط شرکت نوترینو تهران طراحی و سنتز شده بود، استفاده شد. این نانوذرات به صورت محلول کلوئیدی یکنواخت قهوه‌ای رنگ با غلظت ۱۰۰۰ ppm و در فاز آاناتاز تهیه شد. استوک اصلی نانوذرات نقره به صورت محلول و با غلظت ۱۰۰۰ ppm بود. غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره ۶۲/۵، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۵۰۰ ppm با استفاده از حلال دی متیل سولفوکساید (مرک آلمان) تهیه شد. در شکل‌های شماره ۱ و ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) هر دو نانوذره فوق آورده شده است که از شرکت سازنده تهیه گردید. همچنین، رقت‌های مختلف با روش سری رقت از استوک اصلی تهیه شد. در طی انجام مراحل مختلف این پژوهش محلول‌های ساخته شده در شرایط مناسب درون شیشه‌هایی با رنگ تیره و دور از نور آفتاب نگهداری شدند. در هنگام تهیه این محلول‌ها از ماسک مربوطه و دستکش‌های لاتکس استفاده گردید [۱۸].

آزمون تعیین MIC و MFC نانوذرات نقره و نانوذرات طلا به روش میکروداپلوشن

جهت بررسی اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد قارچ (Minimum inhibitory concentration: MIC) و حداقل غلظت کشنده قارچ (Minimum fungicidal concentration: MFC) به روش میکروداپلوشن در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به ترتیب مراحل زیر انجام گرفت: ابتدا از محیط کشت سابارو دکستروز برات (مرک- آلمان) استریل ۱۰۰ میکرولیتر داخل یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد. در ادامه به اولین چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از بالاترین غلظت محلول نانوذرات نقره اضافه و خوب مخلوط شد (در این مرحله چاهک اول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع استریل و ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانوذرات نقره با غلظت ۲۵۰ یا نصف غلظت اولیه است). از چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول برداشت گردید و به چاهک‌های بعدی که تنها محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود اضافه شد. این روند از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک دهم ادامه پیدا کرد تا تمامی غلظت‌های مورد نظر ساخته شوند و ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دهم دور ریخته شد تا حجم تمام

چاهک‌ها یکسان گردد. چاهک یازدهم به عنوان کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت SDB استریل و به چاهک دوازدهم ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع استریل به عنوان کنترل منفی ریخته شد. در ادامه به همه چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی که قبلاً استاندارد سازی شده بود اضافه شد. برای نانوذرات طلا نیز تحت شرایط آسپتیک، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط سابوروز دکستروز برات به هر یک از ۹۶ خانه چاهک میکروپلیت استریل اضافه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱۰۰ ppm نانوذره طلا به خانه اول میکروپلیت اضافه گردید و رقت ۵۰ ppm در خانه اول به دست آمد. سپس، با سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از خانه اول به خانه دوم اضافه شد و این عمل تا خانه آخر یعنی تا ۹ خانه تکرار شد تا رقت‌های مورد نظر (رقت‌های تهیه شده از نانوذرات طلا ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ ppm به دست آید. خانه‌های ۱۰ و ۱۱ در میکروپلیت مربوط به کنترل مثبت و منفی می‌باشد. در نهایت به همه چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی مربوط به هر ایزوله اضافه شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۶۰-۳۲۰ نانومتر خوانده شد. پس از گذاشتن درپوش روی پلیت الیزا، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰-۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس، توسط دستگاه الیزا جذب نمونه‌ها مجدداً خوانده شد. هر چاهکی که جذب آن بعد از انکوباسیون بیشتر از جذب قبل از انکوباسیون بود، بیان‌گر این است که رشد قارچ در آن چاهک صورت گرفته و کدورت ایجاد شده است که این کدورت ممکن است با چشم نیز قابل مشاهده باشد. اولین چاهکی که در آن کدورت ایجاد نشده بود و جذب قبل و بعد از انکوباسیون تقریباً یکسان داشت، به این معنی است که کدورتی در آن ایجاد نشده و قارچ رشد نکرده است. به عبارت دیگر، نانوذرات نقره رشد قارچ را محدود نموده‌اند. این چاهک حداقل غلظت مهارکنندگی را نشان می‌دهد. به همین ترتیب آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی قابل تشخیص نبود (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. از دو چاهک قبل و بعد از چاهک مربوط به MIC به میزان ۱۰ میکرو-لیتر برداشت شد و به پتری‌دیش حاوی محیط کشت SDA برده شد. از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و از دیسک دارویی فلوکونازول ۲۵ میکروگرم (هایمدیای هند) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه سه بار تکرار گردید و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر بعد از ۴۸ ساعت در ۳۷ °C اندازه-گیری شد. غلظتی که قارچ در روی محیط کشت هیچ‌گونه رشدی نداشت، به عنوان MFC در نظر گرفته شد. این تست برای هر قارچ ۴ بار تکرار شد. در نهایت با استفاده از SPSS ویرایش ۱۵ و آنالیز

نتایج حاصل از انتشار در چاهک نشان می‌دهد که قطر هاله عدم رشد نمونه‌های قارچی با افزایش رقت نانوذرات طلا افزایش می‌یابد. قطر هاله عدم رشد در مورد نانوذرات طلا ۱۰ نانومتر روی ایزوله‌ها، صفر تا ۲۰ میلی‌متر و قطر هاله عدم نانوذره نقره صفر تا ۱۳ میلی‌متر بود. جدول شماره ۱ میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد در چهار غلظت مختلف از نانوذرات طلا و نانوذرات نقره مورد بررسی را نشان می‌دهد. میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ ppm از نانوذرات طلا بزرگتر از میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ ppm از نانوذره نقره می‌باشد و نانوذرات طلا در مقایسه با نانوذره نقره، در هر چهار غلظت بررسی شده میانگین قطر هاله عدم رشد بالاتری داشت؛ سطح معنی‌داری آزمون تقریباً برابر با صفر بود ($P < 0.001$). شکل‌های شماره ۳ و ۴ نیز تأثیر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ ppm از نانوذرات طلا و غلظت‌های ۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۶۲/۵ و ۵۰۰ ppm از نانوذره نقره را به وضوح نشان داده که نانوذرات طلا در غلظت‌های مختلف بیشترین قطر هاله عدم رشد را داشته‌اند. مقادیر قطر هاله عدم رشد در فلوکونازول همان‌طور که انتظار می‌رفت، برابر ۱۸ میلی‌متر بود.

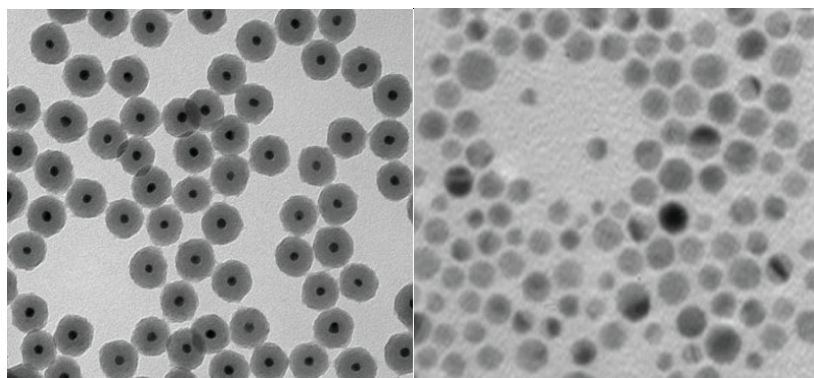
تفاوت میانگین‌ها بررسی شده و جداول و نمودارها با نرم‌افزار Excel 2010 رسم شد. نتایج در سطح معنی‌دار $P < 0.001$ بررسی شد [۱۹].

روش انتشار در آگار

با انتهای پیبت پاستور، چاهک‌هایی در فواصل معینی از یکدیگر روی محیط کشت ایجاد گردید. محیط کشت SDA توسط ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر تلقیح شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ ppm تهیه شده از نانوذرات طلا به هر چاهک اضافه شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm تهیه شده از نانوذره نقره به هر چاهک اضافه گردید. از دیسک حاوی فلوکونازول به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند و وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد در اطراف چاهک‌ها بررسی گردید [۲۰].

نتایج

نتایج تست چاهک حاصل از تاثیر نانوذرات طلا روی نمونه‌های کاندیدا آلیکنس



شکل شماره ۱- تصویر TEM از نانوذرات نقره شکل شماره ۲- تصویر TEM از نانوذرات طلا

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های از نانو ذرات طلا و نانو ذرات نقره (برحسب میلی متر)

غلظت	غلظت	غلظت	غلظت
$\bar{X} \pm SD$	Silver Nanoparticles concentration	$\bar{X} \pm SD$	Gold nanoparticles concentration
۳/۶۸±۱/۷۳	۶۲/۵	۸/۳۴±۴/۴۲	۵
۶/۳۹±۴/۴۶	۱۲۵	۱۲/۷۶±۹/۸۳	۱۰
۹/۲۶±۷/۶۰	۲۵۰	۱۶/۹۵±۱۳/۶۷	۲۵
۱۲/۸۵±۹/۵۲	۵۰۰	۱۹/۹۲±۱۵/۲۳	۵۰

این روش برای نمونه‌های فوق تعیین شد. MFC و MIC نانو-ذرات طلا به ترتیب $7/93 \pm 4/72$ و $16/68 \pm 9/37$ میلی‌متر و برای

روی نمونه‌های کاندیدیازیس واژن جداسازی شده از بیماران به روش میکروداپلوشن MFC و MIC نتایج نانوذرات طلا بر طبق

نانوذره نقره به ترتیب $21/31 \pm 11/40$ و $32/15 \pm 25/77$ میلی متر به- دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده، فعالیت ضد قارچی نانو- ذرات طلا نسبت به نانوذرات نقره بیشتر بود. نتایج این میانگین ها در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۲- میانگین و انحراف معیار حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) نانوذرات طلا و نانوذرات نقره (برحسب میلی متر)

MFC	MIC	
$16/68 \pm 9/37$	$7/93 \pm 4/72$	Gold nanoparticles
$32/15 \pm 25/77$	$21/31 \pm 11/40$	Silver Nanoparticles

دیسک فلوکونازول



کنترل منفی



شکل شماره ۴

شکل شماره ۳

شکل شماره ۳- نمایش تأثیر غلظت های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm نانوذرات نقره روی ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* به روش انتشار در چاهک
شکل شماره ۴- نمایش تأثیر غلظت های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ppm نانوذرات طلا روی ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* به روش انتشار در چاهک

بحث

حاصل از برهم کنش میکروارگانیسم ها و نانوذرات را نشان دادند؛ این برهم کنش باعث آسیب دیدن سلول های قارچ می شود. نانو- ذرات نقره به سطح سلول میکروبی متصل می شوند و این اتصال باعث تغییرات ساختمانی و آسیب سلول می گردد و به طور خاص فعالیت حیاتی سلول نظیر نفوذپذیری، اثر بر فعالیت آنزیم های زنجیره تنفسی و در نهایت مرگ سلول را منجر می شود. نانوذرات نقره، رشد مخمر را مهار می کند و فعالیت ضد قارچی علیه گونه های مختلف *کاندیدا* دارد. نانوذرات طلا دیواره سلولی و غشای سیتو- پلاسمی را در *کاندیدا آلبیکنس* تخریب می کند و باعث آزاد شدن مواد هوموژن شده و سپس به مواد فیلامنتی متصل شده و باعث متلاشی شدن سلول می گردد [۲۱]. که نتیجه فوق با نتیجه پژوهش حاضر هم پوشانی دارد. فرآیند درمان به وسیله نانوذرات طلا می- تواند باعث کمتر شدن طول دوره درمان و عوارض جانبی ناشی از داروها شود. با توجه به اثبات اثرات نقره روی مرگ سلول های باکتری و قارچ، احتمالاً در تحقیق حاضر نیز این نانوذرات با مکانیسم مشابهی از طریق آزاد سازی رادیکال های آزاد ناشی از نانوذرات نقره به سلول های قارچ حمله نموده و باعث دگرگون-

از مجموع ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* شناسایی شده تعداد ۵۸ نمونه توسط نانوذرات نقره و نانوذرات طلا با قطر ۱۰ نانومتر مهار شدند. قطر هاله ممانعت از رشد بین ۰-۱۹ میلی متر به دست آمد. نتایج حاصل از MIC و MFC نیز این نتایج را تایید کردند. با توجه به اینکه قطر هاله ممانعت از رشد در مورد سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC-۱۶۷۷) و نانوذرات نقره جزء کوچک- ترین هاله ها است می توان گفت سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* طی گذشت زمان بسیار مقاوم شده است؛ به طوری که نانوذرات نقره فعالیت مهاری کمی نسبت به قارچ های بالینی روی این سویه داشتند، درست برعکس نانوذرات طلا که تأثیر بیشتری داشتند. نکته حائز اهمیت آن است که قطر هاله عدم رشد نانوذرات نقره در تمام نمونه ها کمتر از نانوذرات طلا بود. این مسئله بیان گر فعالیت مهاری کم نانوذرات نقره در مقایسه با نانوذرات طلا می باشد. Chwalibog و همکاران بیان کردند که نانوذرات نقره، نانوذرات طلا، و نانوپلاتین (نانوذرات فلزی) برای باکتری ها و قارچ ها مضر هستند و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، تغییرات مورفولوژی

کنند. این تاثیر بر اساس اتصال به سطح سلول‌ها می‌باشد که باعث تغییر و آسیب ساختار سلولی و هم‌چنین عملکردهای سلول نظیر قابلیت نفوذپذیری آن می‌شود. هم‌چنین، با ایجاد شکاف‌ها و حفره‌ها، و اثر بر فعالیت آنزیم‌های زنجیره تنفسی باعث مرگ سلول می‌شوند. در تحقیق Zawrah و همکاران فعالیت ضد میکروبی نانو-ذرات طلا بررسی شد. نانوذرات طلا به سطح کاندیدا آلبیکنس متصل شده و باعث آسیب قابل مشاهده در سلول‌ها همراه با تخریب کامل فلاژل‌ها می‌شود [۲۹]. نصرالهی و همکاران پس از سنتز نانو-ذرات نقره، فعالیت ضد قارچی آن را بر علیه دو نوع قارچ کاندیدا آلبیکنس و ساکارومایسس سرویزیه مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد قارچی قابل توجهی بر علیه دو سویه مورد آزمایش است. میزان IC نانوذرات نقره در علیه دو قارچ نام‌برده به‌میزان چشمگیری کمتر از میزان MIC آمفوتریسین B و فلوکونازول بود، آنها بیان کردند که نانو-ذرات نقره از طریق ایجاد اختلال در پتانسیل غشایی قارچ‌های مذکور فعالیت ضد قارچی خود را اعمال می‌کند. هم‌چنین، آنالیز-هایی که توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفته بود، نشان داد که تشکیل منافذ در غشای سیتوپلاسمی قارچ‌ها سبب مرگ سلولی می‌شود [۳۰]. درحالی‌که در تحقیق حاضر اثر نانوذرات نقره با قطر ۱۰nm کمتر از نانو ذره طلا بود. با توجه به اینکه شکل و غلظت و قطر نانوذرات در خواص آنها تأثیرات زیادی می‌گذارد، شاید بتوان علت تفاوت تأثیر را با توجه به خصوصیات نانوذرات بیان کرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به توان بالقوه نانوذرات طلا و نقره در تاثیر بر ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس، امکان استفاده از آنها در درمان بیماری می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که نانوذرات طلا دارای تاثیر ضدکاندیدایی بسیار خوبی بوده و می‌توان از آن به‌منظور درمان عفونت‌های کاندیدایی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل طرحی از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می‌باشد. از کلیه پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی واحد فلاورجان-قهدریجان که در انجام مراحل مربوط به نانوذرات از هیچ کوششی در راستای انجام این پروژه دریغ ننمودند، تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. هم‌چنین، از مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان تقدیر و تشکر می‌گردد.

سازی میکروارگانسیم‌ها به‌وسیله تبدیل پیوندهای SH به S-Ag شده‌اند. در این مکانسیم نانوذرات نقره به مرور یون‌های نقره از خود ساطع می‌کنند که این یون‌ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH- را در جداره میکروارگانسیم‌ها به باندهای S-Ag- تبدیل می‌کنند و نتیجه این واکنش از بین رفتن میکروارگانسیم‌ها است [۲۲]. Jebali و همکاران نیز خاصیت ضد قارچی نانوذرات طلای کروی را روی ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس و هم‌چنین کاندیدا آلبیکنس استاندارد در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند و همانند تحقیق ما گزارش کردند که نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد قارچی قابل توجهی بر علیه سویه مورد آزمایش است [۲۳]. Martinez-Gutierrez و همکاران در سال ۲۰۱۰ پس از ساخت ۱۵ نوع از نانوذرات نقره و نانوذرات TiO_2 و ترکیبی از این دو، فعالیت ضد میکروبی آنها را بر علیه سویه‌های باکتریایی و قارچی فرصت طلب و پاتوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که نانوذرات نقره در ابعاد ۲۵-۲۰ نانومتر بیشترین فعالیت ضد باکتری را بین سایر نانوذرات ساختگی دارا می‌باشند. هریک از نانوذرات نقره و نانوذرات TiO_2 به‌تنهایی فعالیت ضد قارچی کمی داشتند، اما زمانی‌که در طی دوره سنتز با یکدیگر ترکیب شدند، فعالیت ضد قارچی آنها افزایش یافت [۲۴]. درحالی‌که در تحقیق حاضر نانو-ذرات نقره با قطر ۱۰ nm اثر مهاری ناچیزی روی قارچ‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس و هم‌چنین سویه استاندارد آن داشتند. ممکن است نانوذرات نقره در قطر بیشتر تأثیر مهاری بیشتری نسبت به نانوذره طلا در مورد قارچ‌های مزبور از خود نشان دهند. Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۰ عنوان کردند که نانو ساختارها و نانوذرات به‌طور خاص دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هستند که این خواص می‌توانند به‌منظور تسهیل مدیریت داروهای ضد میکروبی و غلبه بر برخی محدودیت‌های موجود در روش‌های درمانی ضد میکروبی سنتی به‌کار روند. در مطالعه حاضر نانوذرات نقره کروی با قطر ۱۰ نانومتر تأثیر مهاری قابل توجهی از خود نشان ندادند، لذا جهت استفاده درمانی نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه می‌باشد [۲۵، ۲۶]. Kim و همکاران فعالیت ضد قارچی نانوذرات نقره را بر علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس گزارش نمودند و نشان دادند که نانوذرات نقره از طریق ایجاد اختلال در ساختار غشا قارچ اثرات ضد قارچی خود را اعمال می‌کنند [۲۷]. هم‌چنین، Wani و همکاران نشان دادند که با توجه به توان بالقوه نانوذرات طلا در تاثیر بر ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس امکان استفاده از آنها در درمان بیماری‌ها می‌تواند مورد توجه قرار گیرد [۲۸]. نانو-ذرات می‌توانند به‌عنوان عوامل ضد باکتریایی و ضد قارچی عمل

References:

- [1] Vrablik J, Masata J, Jedlickova A, Hajicková M. [Prospective study the prevalence of different candida strains and their sensitivity to different antimycotic treatment in women with vulvovaginal candidiasis]. *Ceska Gynecol* 2007; 72(1): 27-32.
- [2] Kent HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165(4 Pt 2): 1168-76.
- [3] Aalei B, Touhidi A. Prevalence of candida vaginitis among symptomatic patients in kerman. *J Qazvin Univ Med Sci* 2000; 4(1): 42-8. [in Persian]
- [4] Mosadegh M, Dehmoubed Sharifabadi A, Nasiri P, Esmaeili S, Naghibi F. The study of phytochemical, antifungal and antibacterial effects of teucrium polium and cichourium intybus. *Scientific J Kurdistan Univ Med Sci* 2002; 7(1): 1-6. [in Persian]
- [5] Biggs WS, Williams RM. Common gynecologic infections. *Prim Care* 2009; 36(1): 33-51, viii.
- [6] Vacheva-Dobrevski R, Kovachev S, Nacheva A, Stoev S, Vasilev N. Comparative study of itraconazole and fluconazole therapy in vaginal candidosis. *Akush Ginekol (Sofia)* 2004; 43(1): 20-3.
- [7] Quan M. Vaginitis: meeting the clinical a challenge. *Clin Cornerstone* 2000; 3(1): 36-47.
- [8] Handa V, Stice CW. Fungal culture findings in cyclic vulvitis. *Obstet Gynecol* 2000; 96(2): 301-3.
- [9] Oriel JD, Partridge BM, Denny MJ, Coleman JC. Genital yeast infections. *Br Med J* 1972; 4(5843): 761-4.
- [10] Cristiano L, Rampello S, Noris C, Valota V. Bacterial vaginosis: prevalence in an Italian population of asymptomatic pregnant women and diagnostic aspects. *Eur J Epidemiol* 1996; 12(4): 383-90.
- [11] Ventolini G, Baggish MS, Walsh PM. Vulvovaginal candidiasis from non-albicans species: retrospective study of recurrence rate after fluconazole therapy. *J Reprod Med* 2006; 51(6): 475-8.
- [12] Khoursandi M, Modares Gilani M, Khosravi AR. Treatment and recurrence of vaginal candidiasis after oral & Vulvovaginal Candidiasis and intravaginal treatment. *J Qazvin Univ medical Sci* 2000; 4(2): 25-9. [in Persian]
- [13] Horowitz BJ. Mycotic vulvovaginitis: abroad overview. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165(4 Pt 2): 1188-92.
- [14] Faye-Kette YH, Kouassi AA, Sylla-Koko DF, Kacou-N'-Douba A, Akoua-Koffi G, Acho YB, et al. [Prevalence of 4 agents of sexually transmitted diseases in leukorrhea in Abidjan (Ivory Coast)]. *Bull Soc Pathol Exot* 1993; 86(4): 245-7.
- [15] Ferris DG, Hendrich J, Payne PM, Getts A, Rassekh R, Mathis D, et al. Office laboratory diagnosis of vaginitis. Clinician-performed tests compared with a rapid nucleic acid hybridization test. *J Fam Pract* 1995; 41(6): 575-81.
- [16] Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2155-62.
- [17] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but donot cause acute cytotoxicity. *Small* 2005; 1(3): 325-7.
- [18] Salata O. V. (2004). Application & Properties of nanoparticles in biology and medicine. *J nano biotechnology*. 2 (3) : 1-8.
- [19] Pfaller M, Messer S. Coparision of visual and spectrophotometris methods of MIC and point determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents including the new triazol. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1094-7.
- [20] Nccls. Methods for antifungal disc diffusion suseptibility testing of yeast, Approved Guideline NCELS Document M44-A. NCCLS. Wayne. Pennsylanias; 2004.
- [21] Chwalibog A, Sawosz E, Hotowy A, Szeliga J, Mitura S, Mitura K, et al. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *Int J Nanomedicine* 2010; 6(5): 1085-94.
- [22] Zhao G, Stevens SE Jr. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion. *Biometals* 1998; 11(1): 27-32.
- [23] Jebali A, Hajjar FH, Pourdanesh F, Hekmatimoghadam S, Kazemi B, Masudi M, et al. Silver and gold nanostructures: antifungal property of different shapes of these nanostructures on Candida species. *Med Mycol* 2014; 52(1): 65-72.
- [24] Martinez-Gguterrez F, Olive PL, Banuelos A. Characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine* 2010; 6(5): 681-8.
- [25] Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu CM, Huang CM. Developmant of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem* 2010; 17(6): 585-94.
- [26] Zheng Y, Sache L. Gold nanoparticles enhance DNA damage induced by anti-cancer drugs and radiation. *Radiat Res* 2009; 172(1): 114-9.
- [27] 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): 235-42.
- [28] Wani IA, Ahmad T, Manzoor N. Size and shape dependant antifungal activity of gold nanoparticles: a case study of Candida. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 101(1): 162-70.
- [29] Zawrah MF, El-Moez SA, Center D. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. *Life Sci J*

مقایسه اثرات ضد قارچی نانو ذرات طلا، ...

2011; 8(4): 37-44.

[30] Nasrollahi A, Pourshamsian KH, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver

nanoparticles on some os fungi. *Int J Nano Dim* 2011; 1(3): 233-9.