Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(123): 12-21

Antifungal Activity of Silver Nanoparticles, Copper Nanoparticles, Their Combination and with Amphotericin B against *Candida glabrata* In vitro and In vivo

Mahdi Jafarzadeh[1], Mojtaba Salouti[2*], Rasoul Shokri[3]

1. MSc in Microbiology, Faculty of Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Professor, PhD of Medical Physics, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

Received: 9 May 2017, Accepted: 2 Aug 2017

Abstract

Background: *Candida glabrata* is the fourth most common cause of blood infection in America and, due to its resistance to amphotericin B, we have to look for new therapies. The aim of this study was to evaluate the antifungal properties of silver nanoparticles, copper and combine them together with amphotericin B in order to produce an effective drug.

Materials and Methods: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) for nano silver copper and combining them together and amphotericin B was conducted by macro dilution. By intraperitoneal injection, anti-fungal effect of nano silver, copper and combining them together and amphotericin B was evaluated in a mouse model.

Results: The amounts of MIC and MFC for silver nanoparticles, copper nanoparticles and their combination were 31 and 62.50 ppm, 31 and 62.50 ppm, and 31and 15.50 ppm, respectively. The amounts of MIC and MFC for the combination of silver nanoparticles and amphotericin B were 8 and 15.5 ppm, also, 15.5 and 31 ppm for the combination of copper nanoparticles and amphotericin B. Mouse model study confirmed the effect of silver nanoparticles, copper nanoparticles and combining them together and amphotericin B against *Candida glabrata*. The combination of silver and copper nanoparticles had maximum effect and the combination of silver and copper nanoparticles with amphotericin B had minimum effect in animal model.

Conclusion: The combination of silver and copper nanoparticles has a better effect than other groups.

Keywords: Antifungal effect, Candida glabrata, Copper nanoparticles, Silver nanoparticles

*Corresponding Author:
Address: Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
Email: saloutim@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۶ (شماره پیاپی ۱۲۳)، شهریور ۱۳۹۶، ۲۱-۱۲

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس و ترکیب آن‌ها با یکدیگر و با آمفوتریسین B علیه کاندیدا گلابراتا در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

مهدی جعفرزاده[۱]، مجتبی صلوتی[۲*]، رسول شکری[۳]

۱-کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
۲- استاد، دکتری فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: کاندیدا گلابراتا چهارمین عامل رایج عفونت خونی در آمریکا است و به دلیل مقاومت آن به آمفوتریسین B باید به دنبال روش های درمانی جدید باشیم. هدف از این مطالعه، بررسی خاصیت ضد قارچی نانو ذرات نقره، مس و ترکیب آن‌ها باهم و با آمفوتریسین B به منظور تولید دارویی مؤثر می‌باشد.

مواد و روش ها: حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC) برای نانو ذرات نقره، مس و ترکیب آن‌ها با هم و با آمفوتریسین B به روش ماکرودیلوشن انجام گرفت. با تزریق درون صفاقی، اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره، مس و ترکیب آن‌ها با هم و با آمفوتریسین B در مدل موشی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها : MIC و MFC نانو ذرات نقره ۳۱ و۶۲/۵۰ ppm، نانو ذرات مس ۳۱ و ۶۲/۵۰ ppm و ترکیب آن ها ۱۵/۵۰ و ۳۱ ppm بودند. مقادیر MIC و MFC ترکیب نانو ذرات نقره با آمفوتریسین B، ۸ و ۱۵/۵۰ ppm و ترکیب نانو ذرات مس و آمفوتریسین B، ۱۵/۵۰ و ۳۱ ppm بودند. مطالعه مدل موشی نیز اثر نانو ذرات نقره، مس و ترکیب آن‌ها با هم و با آمفوتریسین B برعلیه کاندیدا گلابراتا را تایید کرد. ترکیب نانوذرات نقره و مس دارای بیشترین اثر و ترکیب نانو ذرات نقره ومس با آمفوتریسین B دارای کمترین اثر در مدل حیوانی بودند.

نتیجه گیری: ترکیب نانوذرات نقره و مس دارای اثر بهتری نسبت به سایر گروه ها هستند.

واژگان کلیدی: کاندیدا گلابراتا، اثر ضد قارچی ، نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس

***نویسنده مسئول:** ایران، زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی

Email: saloutim@yahoo.com

مقدمه

کاندیدا گلابراتا مخمر هاپلوئید از جنس کاندیدا است که قبلا با عنوان تورولوپسیس گلابراتا شناخته شده است. این گونه از مخمر دوشکلی (دیمورف) نیست و هیچگونه فعالیت جفت گیری مشاهده نشده است (۱). هم-چنین آنیدولافونجین به همراه وریکونازول هیچ تعامل یا تاثیری بر روی این گونه های کاندیدا ندارد و کاندیدا تروپیکالیس مقاوم ترین کاندیدا در برابر اثرات این داروها می باشد(۱۱). نانو ذرات نقره برای عوامل بیماری زا یک سم تلقی می شوند و برای بدن انسان ، غذاها و بافت ها بی ضررند(۱۲). این درحالی است که نقره به خودی خود فاقد و یا خیلی کمتر دارای این خاصیت است. نقره از دیرباز به عنوان یک ماده ی ضد عفونی کننده مورد توجه بوده است، ولی به دلیل خاصیت باکتری کشی کم و با توسعه ی آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی ضد باکتری، استفاده از آن محدود شده بود. با این حال، با توسعه ی تولید نانو ذرات نقره استفاده ی مجدد از نقره به عنوان ماده ی باکتری کش قدرتمند رونق یافته است(۱۲). بررسی های حاضر نشان می دهدکه نانوذرات نقره دارای اثر ضد قارچی بیشتری در مقایسه با آمفوتریسین B و فلوکونازول می باشد و می تواند به عنوان یک داروی ضد قارچی بر علیه کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس استفاده شود(۱۳). نانوذرات مس که بسیار کوچک هستند ودارای نسبت سطح به حجم بالا می باشند،به عنوان عوامل ضد قارچی و ضد باکتری استفاده می شوند(۱۴). فعالیت ضد میکروبی تعامل بسیار نزدیکی با غشا میکروبی داردو یون های فلزی خود را در محلول ها آزاد می کند(۱۴). با توجه به اینکه اثرات ضد میکروبی نانو ذرات نقره و نانو ذرات مس بر روی میکروب های مختلف تائید شده است. هدف از مطالعه حاضر، سنجش میزان فعالیت نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس و اثر ترکیبی آن ها با یکدیگر و با آمفوتریسین B به عنوان روش جدید مقابله با عفونت های حاصل از قارچ کاندیدا گلابراتا در شرایط آزمایشگاهی و در مدل حیوانی می‌باشد.

کاندیدا گلابراتا مخمر هاپلوئید از جنس کاندیدا است که قبلا با عنوان تورولوپسیس گلابراتا شناخته شده است. این گونه از مخمر دوشکلی (دیمورف) نیست و هیچگونه فعالیت جفت گیری مشاهده نشده است (۱). هم-چنین چهارمین عامل عفونت خونی در آمریکاست که سبب ایجاد عفونت و بیماری در واژن ودستگاه گوارش می شود(۳،۲). تا همین اواخر، کاندیدا گلابراتا در درجه اول یک ارگانیسم غیر بیماری زا تصور شده است. با این حال با افزایش جمعیت افراد دچار نقص ایمنی، کاندیدا گلابراتا به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در دستگاه ادراری و جریان خون در نظر گرفته می شود (۴). بسیاری از گونه های کاندیدا بیماری های مختلفی را ایجاد می کند. یکی از این بیماری ها بیماری مرتبط با دهان و مری است که معمولاً به صورت برفک مشاهده می شود(۵). بیماری دیگری که به کاندیدا گلابراتا نسبت داده شده است کاندیدیازیس موجود در واژن (vvc) است که در ۲۰ درصد از زنان در سراسر جهان جداسازی شده است (۶). فلوکونازول و آمفوتریسین B داروهای پیشنهادی برای درمان عفونت کاندیدا گلابراتا هستند. با وجود این که برخی از سویه ها دارای مقاومت ذاتی به فلوکونازول می باشند و از آن جایی که بیماران مبتلا از این عفونت رنج می برند، معمولاً در شرایط بحرانی استفاده از آمفوتریسین B محدود می شود. برخی مطالعات حیوانی نشان داده است که اثر بخشی فلوکونازول معادل آمفوتریسین B است، ولی در سایرین آمفوتریسین B به وضوح نشان داده که در پاک سازی عفونت قارچی کارآمدتر است(۹-۷). پلین ها از جمله آمفوتریسین B داروهای ضد قارچی هستند که بیش از ۵۰ سال مورد استفاده قرار گرفته اند. این مواد به درون غشاهای حاوی ارگسترول(اغلب غشای پلاسمایی) وارد می شوند و در نتیجه منافذی را تشکیل می دهند که باعث نشت ترکیبات سلولی می شود، شیب یونی و الکتریکی را از بین می برد و در نهایت منجر به مرگ سلولی می شود(۱۰). بررسی ها نشان می

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی ، سویه استاندارد کاندیدا گلابراتا (IFRC1063) به صورت لیوفیلیزه از (کلکسیون قارچی مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی دانشگاه مازندران) خریداری گردید.آمفوتریسین B به صورت پودر از (شرکت بهنوژن آزمافرد) تهیه و با آب مقطر استریل به غلظت مورد نیاز رسانده و مورد استفاده قرار گرفت . نانو ذرات مس به‌صورت پودر از (شرکت نانو مهرگان شیمی) با قطر ۲۰ نانومتر تهیه شد و با توجه به غلظت مورد نیاز با استفاده از دستگاه اولتراسونیک در آب مقطر استریل حل گردید. نانو ذرات نقره با غلظت ppm ۴۰۰۰، دارای شکل کروی با قطر ۶۰-۵۰ نانومتر با نام تجاری NANOCOLLOID از شرکت (NANO NASB PARS) خریداری شد. محیط‌های کشت مورداستفاده (سابرودکستروز آگار و سابرودکستروز براث) از شرکت (مولتی مدیا) محصول کشور مجارستان تهیه شد. موش‌های سوری ماده شش الی هشت‌هفته‌ای با وزن تقریبی ۵±۲۵ گرم از (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج) تهیه گردید.

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس و ترکیب آن‌ها با یکدیگر و با آمفوتریسین B بر روی کاندیدا گلابراتا به روش ماکرودیلوشن (رقت در براث)

برای آماده کردن سوسپانسیون قارچی در شرایط استریل از کلنی‌های تک رشد کرده، که دست‌کم دارای یک میلی‌متر قطر بودند، با استفاده از آنس استریل برداشته و وارد دو میلی‌لیتر آب مقطر استریل کرده تا سوسپانسیون موردنظر به غلظت نهایی نیم مک فارلند(۲/۵ × ۱۰۳ CFU/ml) رسانده شود (۱۵). غلظت‌های ppm۴۰۰۰، ppm ۲۰۰۰، ppm ۱۰۰۰،ppm ۵۰۰، ppm ۲۵۰، ppm ۱۲۵، ppm ۶۲/۵۰، ppm ۳۱، ppm ۱۵/۵۰، ppm ۸، ppm ۴، ppm۲ و ppm۱ از نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس، آمفوتریسین B و ترکیب آن‌ها در آب مقطر دیونیزه در میکروتیوب های استریل تهیه گردید. به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC- Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC- Minimum Fungicidal Concentration) از روش مایکرودیلوشن (رقت در براث) در شش مرحله جدا از هم استفاده شد:

الف) بررسی اثر نانو ذرات مس بر روی کاندیدا گلابراتا

برای شروع کار از محیط کشت آماده‌شده سابرو دکستروز براث مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر داخل ۱۵ چاهک های موردنظر(در هر ردیف ۱۲ چاهک وجود دارد،۱۲ چاهک از ردیف اول و ۳ چاهک از ردیف دوم انتخاب شد) از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شدند، در مرحله بعد به هرکدام از چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از نانو ذرات مس اضافه شد، درنهایت به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون قارچی با کدورت نیم مک فارلند اضافه گردید. ضمن اینکه دو مورد از چاهک‌ها به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد،به‌این‌ترتیب که یکی از چاهک‌ها که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی بود ، به عنوان شاهدمثبت و چاهک دیگر که حاوی محیط کشت و نانوذرات مس بود ، به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. در آخر میکروپلیت به مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد و پس‌ازآن میکروپلیت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از ۷۲ ساعت چاهک ها ازلحاظ کدورت ناشی از رشد قارچ تلقیح شده موردبررسی قرار گرفتند اولین غلظتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی قابل‌تشخیص نبود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. در پایان از تمامی چاهک‌ها که در آن عدم رشد مشاهده شده بود ، مقدار ۱۰ میکرو لیتر در پلیت حاوی محیط کشت سابرو دکستروزد آگار کشت داده شدند و پلیت ها به مدت ۷۲

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. بعد از ۷۲ ساعت پلیتی که حاوی کمترین غلظت نانو ذرات مس بوده و در آن عدم رشد مشاهده گردید به عنوان MFC در نظر گرفته شد. تمامی مراحل این روش با سه بار تکرار انجام گردید(۱۶).

ب) بررسی اثر نانو ذرات مس و ضد قارچ آمفوتریسین B (اثر ترکیبی) بر روی کاندیدا گلابراتا

در این مرحله به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از نانو ذرات مس و ۵۰ میکرو لیتر از غلظت‌های مورد نظر از ضد قارچ آمفوتریسین B اضافه شد، در ضمن دو مورد از چاهک‌ها به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، به این ترتیب که یکی از چاهک‌ها که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی بود، به‌عنوان شاهد مثبت و چاهک دیگر که حاوی محیط کشت و نانو ذرات مس و ضد قارچ آمفوتریسینB (به‌صورت ترکیبی) بود، به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. کلیه مراحل این روش همانند روش فوق انجام گردیده است. تمامی مراحل این روش با سه بار تکرار انجام گردید(۱۷).

پ) بررسی اثر نانو ذرات نقره بر روی کاندیدا گلابراتا

در ابتدا به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از نانو ذرات نقره اضافه شد، در ضمن دو مورد از چاهک‌ها به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، به این ترتیب که یکی از چاهک‌ها که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی بود ، به‌عنوان شاهد مثبت و چاهک دیگر که حاوی محیط کشت و نانو ذرات نقره بود ، به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. کلیه مراحل این روش همانند روش فوق انجام گردیده است. تمامی مراحل این روش با سه بار تکرار انجام گردید(۱۶).

ت) بررسی اثر نانو ذرات نقره و ضد قارچ آمفوتریسین B (اثر ترکیبی) بر روی کاندیدا گلابراتا

در این مرحله به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از نانو ذرات نقره و ۵۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از ضد قارچ آمفوتریسین B اضافه شد، در ضمن دو مورد از چاهک‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، به‌این‌ترتیب که یکی از چاهک‌ها که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی بود ، به‌عنوان شاهد مثبت و چاهک دیگر که حاوی محیط کشت و نانو ذرات نقره و ضد قارچ آمفوتریسین B (به‌صورت ترکیبی) به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد.کلیه مراحل این روش همانند روش فوق انجام گردیده است. تمامی مراحل این روش با سه بار تکرار انجام گردید(۱۸-۲۱).

ث) بررسی اثر ضد قارچ آمفوتریسین B بر روی کاندیدا گلابراتا

در این مرحله به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از آمفوتریسین B اضافه شد، در ضمن دو مورد از چاهک‌ها به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، به‌این‌ترتیب که یکی از چاهک‌ها که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی بود ، به‌عنوان شاهد مثبت وچاهک دیگر که حاوی محیط کشت و آمفوتریسین B بود، به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. کلیه مراحل این روش همانند روش فوق انجام گردیده است. تمامی مراحل این روش با سه بار تکرار انجام گردید(۲۱).

ج) بررسی اثر نانو ذرات مس و نانو ذرات نقره (اثر ترکیبی) بر روی کاندیدا گلابراتا

در ابتدا به هر یک از چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از نانو ذرات مس و ۵۰ میکرو لیتر از غلظت‌های موردنظر از نانو ذرات نقره اضافه شد، در ضمن دو مورد از چاهک‌ها به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، به‌این‌ترتیب که یکی از چاهک‌ها که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی بود ، به‌عنوان شاهد مثبت و چاهک دیگر که حاوی محیط کشت و نانو ذرات مس و نانو ذرات نقره (به‌صورت ترکیبی) به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد.

کلیه مراحل این روش همانند روش فوق انجام گردیده است. تمامی مراحل این روش با سه بار تکرار انجام گردید(۱۶،۱۷،۲۱).

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس و ترکیب آن‌ها با یکدیگر و با آمفوتریسین B بر روی کاندیدا گلابراتا در مدل حیوانی

در مدل حیوانی، از موش‌های سوری ماده شش الی هشت‌هفته‌ای با وزن تقریبی ۵±۲۵ گرم استفاده شد. ۲۱ سر موش سوری ماده به هفت گروه سه‌تایی تقسیم شده و به صورت جداگانه در قفس های جدا گذاشته شدند.این هفت گروه شامل : گروه اول گروه درمانی با نانوذرات مس ، گروه دوم گروه درمانی با آمفوتریسیB،گروه سوم گروه درمانی با نانو ذرات مس و ضد قارچ آمفوتریسین B (به‌صورت ترکیبی)، گروه چهارم گروه درمانی با نانوذرات نقره ، گروه پنجم گروه درمانی با نانو ذرات نقره و ضد قارچ آمفوتریسین B (به‌صورت ترکیبی)،گروه ششم گروه درمانی با نانو ذرات مس و نانو ذرات نقره (به‌صورت ترکیبی) و گروه هفتم به عنوان گروه شاهد هستند. برای ایجاد عفونت تجربی در موش‌های انتخابی، به تمامی موش‌ها از کشت ۷۲ ساعته قارچی (محیط کشت سابرو دکستروز آگار)، سوسپانسیون قارچی با غلظت نیم مک فارلند به وسیله سرم فیزیولوژی به مقدار ۳۰۰ میکرو لیتر تهیه و به‌صورت داخل صفاقی به همه گروه‌های موردنظر تزریق شد و ۳ شبانه روزبه موش‌ها فرصت ایجاد عفونت داده شد(۲۵-۲۲). در این مرحله در موش‌های کلیه گروه که عفونت ایجادشده بود، ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت MFC هر ماده به‌صورت درون صفاقی به موش‌ها تزریق شد. پس‌ازآن موش‌ها به مدت ۳ شبانه‌روز در شرایط یکسان و با آب، غذا، تهویه و نور مناسب نگهداری شدند. بعد از طی دوره درمان هر یک از موش‌ها در دسیکاتور حاوی اتر کشته شدند و طحال موش‌ها در شرایط استریل خارج گردیده و در ۱۰۰۰ میکرو لیتر سرم فیزیولوژی هموژنیزه شدند سپس از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر بر روی محیط سابرو دکستروز آگار کشت انجام گرفت و پلیت ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و درنهایت شمارش کلونی‌های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از شمارش گر کلونی انجام گردید(۲۵-۲۲).

به منظور تجزیه وتحلیل آماری نتایج حاصل، آزمون آماری آنالیز واریانس ANOVA و آزمون تعقیبی LSD تحت نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمون $p>0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین MIC و MFC به روش مایکرودیلوشن که در غلظت‌های ppm ۱ تا ppm ۴۰۰۰ از نانو ذرات مس ، نانو ذرات نقره، ضد قارچ آمفوتریسین B و ترکیب آن‌ها در محیط سابرو دکستروز براث انجام گردید، در جدول ۱ نشان داده‌شده است. در مدل حیوانی، آنالیز آماری نتایج مربوط به بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس، ضد قارچ آمفوتریسینB و اثر ترکیبی آن‌ها بر روی کاندیدا گلابراتا در مدل موشی ماده در جدول ۲ نشان دادکه اختلاف معنی‌داری بین شش گروه تیماری مختلف و گروه کنترل مثبت مورد مطالعه وجود دارد یعنی اینکه همه گروه‌های تیماری اثر ضد میکروبی دارند. در جدول ۱ غلظت هرکدام از نانوذرات به همراه MIC و MFC آنها مورد بررسی قرار گرفته است و در جدول ۲ میانگین شمارش کلونی ها (همان قارچ ها) پس از گذشت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفته است که در گروه مربوط به اثر ترکیبی نانوذرات مس و نانوذرات نقره تعداد کلنی ها از سایر گروه ها کمتر و در گروه مربوط به اثر ترکیبی نانوذرات نقره و آمفوتریسین Bتعداد کلنی ها از سایر گروه ها بیشتر است.

جدول ۱. میزان *MIC* و *MFC* نانو ذرات مس، نانو ذرات نقره، ضد قارچ آمفوتریسین *B* و اثرات ترکیبی آن‌ها بر روی کاندیدا گلابراتا

غلظت	MIC	MFC
نانو ذرات مس	۳۱ ppm	۶۲/۵۰ppm
نانو ذرات نقره	۳۱ ppm	۶۲/۵۰ ppm
آمفوتریسین B	۱۵/۵۰ ppm	۳۱ ppm
نانو ذرات مس و آمفوتریسین B	۱۵/۵۰ ppm	۳۱ ppm
نانوذرات نقره و آمفوتریسین B	۸ ppm	۱۵/۵۰ ppm
نانوذرات مس و نانوذرات نقره	۱۵/۵۰ppm	۳۱ ppm

جدول ۲. نتایج شمارش کلنی و اثر مهاری نانو ذرات مس ، نانوذرات نقره ، ضد قارچ آمفوتریسین *B* و اثر ترکیبی آن‌ها بر روی موش‌های سوری آلوده به کاندیدا گلابراتا

نتایج	میانگین شمارش کلونی‌ها	انحراف معیار
نانو ذرات مس	۱۱۴	۲۲
نانو ذرات نقره	۱۰۰	۱۸
آمفوتریسین B	۱۵۰	۳۱
نانو ذرات مس و آمفوتریسین B	۱۱۶	۲۵
نانوذرات نقره و آمفوتریسین B	۱۴۴	۲۹
نانوذرات مس و نانوذرات نقره	۵۰	۸
کنترل مثبت	۲۶۶۰۰۰	۲۳۰۰۰

بحث

اهمیت بیماری های قارچی فرصت طلب در بیماران مبتلا به نقایص سیستم ایمنی و خصوصاً ایمنی سلولی برکسی پوشیده نیست و کاندیدیازیس بدون شک یکی از مهم‌ترین و شایع ترین بیماری های قارچی فرصت طلب در انسان است که به صورت حاد، تحت حاد و مزمن در پوست، ناخن، مخاط واژن، ریه و دستگاه گوارش یا به صورت سیستمیک همراه با مسمومیت خونی، اندوکاردیت و منتژیت مشاهده می شود(۲۹،۱۹). بیماری های کاندیدیایی شایع ترین عفونت قارچی در انسان و حیوان می باشد. امروزه از مشکلات اصلی در راه درمان بیماران مبتلا به عفونت های قارچی و خصوصاً بیماری های کاندیدیایی، بروز مقاومت نسبت به داروهای ضد قارچی و هم چنین افزایش میزان بروز عفونت های قارچی و استفاده از داروهای ضد قارچی مختلف است. همچنین عفونت های همراه با علائم ناشی از کاندیدا گلابراتا غالباً به سختی درمان می شوند و اغلب سویه ها حساسیت کمتری به داروهای ضد قارچی دارند، از این رو باید تدابیر و روش های درمانی جدیدی را اتخاذ نمود(۲۶). تاکنون مطالعه چندانی بر روی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره، نانو ذرات مس و اثر ترکیبی آن‌ها با ضد قارچ آمفوتریسین B علیه عفونت ناشی از کاندیدا گلابراتا به خصوص در مدل حیوانی نشده است.براساس مطالعه حاضر، ترکیب نانوذرات مس ونانوذرات نقره بسیار مؤثرتر از سایر گروه‌ها به‌ویژه ضد قارچ آمفوتریسین B است.نانوذرات مس، نانوذرات نقره، ترکیب نانوذرات نقره هم‌چنین نانوذرات مس با ضد قارچ آمفوتریسین B باهم نیز اثر هم‌افزایی چشمگیری نداشته و نمی توانند جایگزین اثر ترکیبی نانوذرات مس و نانوذرات نقره شوند. ولی می‌توان از آن‌ها استفاده برد تا میزان استفاده از ضد قارچ کاهش یابد. نتایج تعیین MIC و MFC به روش ماکرودیلوشن در مطالعه حاضر نشان داد که اثر ترکیبی نانوذرات مس و نانوذرات نقره نسبت به هرکدام از عوامل به‌تنهایی، دارای خاصیت ضد قارچی بیشتری بر روی کاندیدا گلابراتا می‌باشد(جدول ۱). این یافته ها با نتایج حاصل از پژوهش نفیسا خاتون و همکاران که مطالعه مشابهی را بر روی پاتوژن‌های قارچی فرصت‌طلب کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گالابراتا و کاندیدا تروپیکالیس انجام دادند، مطابقت دارد(۲۷). هم چنین در مطالعه ای دیگر، افسانه اصغری و همکارانش در سال ۱۳۹۴، اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره را بر روی عوامل مولد ولوواژینیت کاندیدایی در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که نانوذرات کروی با قطر ۱۰ نانومتر تا حدودی دارای فعالیت ضد قارچی علیه کاندیدا آلبیکنس می باشد.

MIC نمونه ها بین ۲۵/۳۱ تا ۱۲۵ ppm و MFC نمونه ها بین ۶۲/۵ تا ۲۵۰ ppm بود (۳۰). در تحقیق حاضر، MIC نانوذرات نقره ۳۱ ppm و MFC نانوذرات نقره ۶۲/۵۰ ppm بود و قطر آن ۲۰ نانومتر بود و زمانی که با نانوذرات مس ترکیب می شوند، اثرگذاری بیشتری بر روی کاندیدا گلابراتا دارد. نتایج روش ماکرودیلوشن نشان داد که ترکیب نانوذرات مس و نانوذرات نقره در غلظت‌های پایین می‌توانند از رشد قارچ کاندیدا گلابراتا جلوگیری کنند که این نتایج با یافته‌های حاصل از سهر ام. اودا و همکاران که فعالیت ضد قارچی نانوذرات مس و نقره را بر روی دو بیماری زای گیاهی بررسی کردند، مطابقت دارد(۲۸). نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش های انجام‌شده بر روی مدل حیوانی (جدول ۲) نیز نشان می‌دهند که ترکیب نانوذرات مس و نانوذرات نقره در موش‌های سوری ماده می‌تواند آثار ضد قارچی خود را بر روی عفونت ناشی از کاندیدا گلابراتا حفظ کرده و به صورت ترکیبی دارای اثر ضد قارچی می باشد. هم چنین آنالیز آماری نتایج مدل حیوانی نشان می‌دهد که ترکیب نانوذرات مس و نانوذرات نقره دارای خاصیت ضد قارچی بیشتری علیه عفونت های حاصل از کاندیدا گلابراتا نسبت به ضد قارچ آمفوتریسین B می‌باشد. با افزایش غلظت نانوذرات مس و همین طور نانوذرات نقره، رشد قارچ کاهش‌یافته است لذا می‌توان گفت که اثر نانو ذرات مس و نانوذرات نقره وابسته به دوز مصرفی است و با افزایش غلظت آن اثر ضد قارچی آن نیز افزایش می یابد. در جدول ۲ نتایج مربوط به مدل حیوانی گروه‌های تیماری مورد آزمایش باهم مقایسه گردیده است، به طوری که بین گروه های تیماری نانوذرات مس، نانوذرات نقره و اثر ترکیبی آن ها تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود، ولی اختلاف معناداری بین گروه های مذکور با گروه های تیماری ضد قارچ آمفوتریسین B و ترکیب این ضد قارچ با نانو ذرات مس و نانوذرات نقره وجود دارد. هم‌چنین بین گروه های تیماری ترکیب نانو ذرات نقره و آمفوتریسین B، ترکیب نانو ذرات مس و آمفوتریسین B و ضد قارچ آمفوتریسین B نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری

ترکیب نانوذرات مس و نانوذرات نقره بسیار مؤثرتر از ضد قارچ آمفوتریسین B است. اثر نانوذرات نقره تا حدی با اثر ترکیبی نانوذرات مس و نانوذرات نقره برابر بوده است و کاهش میزان رشد قارچ در هنگام استفاده از این نانوذرات نقره به تنهایی نسبت به سایر گروه ها معنی‌دار می‌باشد. ترکیب نانو ذرات مس و یا نانو ذرات نقره با ضد قارچ آمفوتریسین B نیز اثر هم افزایی چشمگیری برعلیه قارچ کاندیدا گلابراتا نداشته، ولی می توان از آن‌ها برای کاهش میزان استفاده از ماده ضد قارچ استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات بیولوژی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان انجام شد و حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی با عنوان «بررسی اثر هم افزایی نانوذرات مس و نقره بر روی کاندیدا گلابراتا» می باشد. بدین وسیله از کلیه مسئولین محترم مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Hommel, R.K. Torulopsis. In Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; pp. 596–602.
2. Bialkova, A.; Šubík, J. Biology of the pathogenic yeast Candida glabrata. Folia Microbiol. 2006,51, 3–20.
3. Rodrigues, C.F.; Silva, S.; Henriques, M. Candida glabrata: A review of its features and resistance. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2014, 33, 673–688.

4. Tsuyoshi, N.; Fudou, R.; Yamanaka, S.; Kozaki, M.; Tamang, N.; Thapa, S.; Tamang, J.P.Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. Int. J. Food Microbiol. 2005, 99, 135–146.
5. Bethea, E. K.; Carver, B. J.; Montedonico, A. E.; Reynolds, T. B. (2009). "The inositol regulon controls viability in Candida glabrata". Microbiology: 452–462.
6. Bialkova, A.; Šubík, J. Biology of the pathogenic yeast Candida glabrata. Folia Microbiol. 2006, 51, 3–20.
7. Fisher M.A, Shen S.H, Haddad J, Tarry W. F. Comparison of in vivi activity of fluconazole with that of amphotericin B against Candida tropicalis, candida glabrata, and candida krusei. Antimicrob. Agants chemother. 1989, 1443-1446.
8. Marine Marcal, Carolina Serena, Fernandez-Torres Belkys, Javier Pastor F and Guarro Josep. Activities of flucytosine, fluconazole amphotericin b, and micafungin in a murine model of disseminated infection by candida glabrata. Antimicrob. Agents chemother. 2005; 4757-4759.
9. Nagappan V, Boikov D, Vazquez J. A. Asseeement of the in vitro kinetic activity of caspofungin against candida glabrata. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010; 522-525.
10.Ellis, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. J. Antimicrob. Chemother. 2002,7-10.
11.Valentı´n A, Canto´n E, Pema´n J, Fernandez-Rivero M. E, Tormo-Mas M. A, Martı´nez J. P. In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five Candida species. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published August 19, 2016.
12.Xi-Feng Zhang, Zhi-Guo liu,Wei shen,Sangiliyandi Gurunathan. SilverNanoparticles: Synthesis, Characterization,Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. International Journal of Molecular Sciences, 2016,17, 1534.
13. Kim JH, Cho H, Ryu SE, Choi MU. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: Highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu2+ ion. Arch Biochem Biophys, (2000), 382:72–80.
14. Ramyadevi, J.; Jeyasubramanian, K.; Marikani, A.; Rajakumar, G.; Rahuman, A. A. "Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles". Mater. Lett. (2012) 71: 114–116.
15. Salehei Zahra, Seifi Zahra, Zarei Mahmoudabadi Ali.[Sensitivity of Vaginal Isolates of Candida to Eight Antifungal Drugs Isolated From Ahvaz, Iran, Jundishapur J Microbiol]. 2012; 574-577.
16. Gholami Shabani M.H, Imani A ,Chamani M.[Antimicrobial properties of coated nanoparticle coated nanosilver coated with Fusarium eggsporum and bacteria officinalis]. Journal of New Cellular-Molecular Biotechnology, 2012, Volume 2, Issue 6, Pages 4-9.
17. Khosravi Iqbal, Roya.[Antimicrobial effect of silver and copper nanoparticles and comparison with sodium hypochlorite on vegetative and spore cells of Bacillus subtilis and Bacillus cereus]. Journal of Microbiological biotechnology, Islamic Azad University, Winter 2010, Volume 2, Number 7, Pages 37-44.
18. Rohan N, Doody M, Safaynejad Z.[Comparison of antifungal effects of silver nano particles with fluconazole on aspergillus fumigatus]. Journal of Laboratory Sciences. 2013; 7 (2): 8-14.
19. Naeini A, Khosravi A, Tajbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee Roya.[Anti-Candida and immunomodulatory effects of essential oil and extracts of Foeniculum Vulgare Mill under in vitro conditions]. Shahed University Journal of Research. 2009; 16 (82): 7-20.
20. Ghahramanlou A, Rajabi O, Qazvini K, Mir Mirzawi A.T, Motawali Haghighi, M.[Antifungal effect of silver nanoparticles in acrylic resins]. Journal of Mashhad Dental School. 2013; 37 (3): 239-248.
21. Zahra Salehei, Zahra Seifi, Ali Zarei Mahmoudabadi , Sensitivity of Vaginal Isolates

of Candida to Eight Antifungal Drugs Isolated From Ahvaz, Iran, Jundishapur J Microbiol. 2012; 574-577.
22.Alizadeh Hamed, Rahnama Mehdi, Nasiri Semnani Shahrzad, Ajalli Mohsen. [Synergistic Antifungal effects of quince leafs extract and silver nanoparticles on aspergillus niger]. Journal of applied biological scinces. 2014; 8(13): 10-13.
23. Betch L. Hahn, Peter G. Sohnle. Characteristics of dermal invasion in experimental cutaneous andidiasis of leucopenic mice. The journal of investigative dermatology. 1998 ; 91 (3): 233-237.
24.James Venturini, Anuska Marcelino A lvares, Marcela Rodrigues de Camargo, Camila Martins Marchetti, Thais Fernando de Campos Fraga Silva, Ana Carolina Luchini, Maria Sueli Parreira de Arruda.
25.Bindu Shama, Padma Kumar, Suresh Chandra Joshi. Topical treatment of dermatophytic Lesion on mice (musmusculus) model. Indian J Microbial. 2011; 51(2): 217-222.
26.Vincenzo Covelli – Guide to necropsy of the mouse. Division of protection of man and ecosystems, enea, cr-casaccia, via anguillarese 301, 00060 Rome, Italy.
27. Nafeesa K, Abhijeet M, Hammad A, Nikhat M, Meryam S. Biosynthesis, Characterization, and Antifungal Activity, of the Silver Nanoparticles against Pathogenic Candida species, Enzyme Technology Lab, Department of biosciences, Jamia Millia Islamia, New Delhi-25, India, Springer Science+business Media New York 2015.
28. Sahar M.Ouda, Antifungal Activity of Silver and Copper Nanoparticles on two Plant Pathogens,Alternaria alternate and Botrytis cinerea,Reserch Journal of Microbiology: 2014,34-42.
29 Kateiraei F, Khosravi A, Khalaj V, Haji Abdolbaghi M, Khaksar A.A, Rasoolinejad M.[Sensitivity of oral candidates for HIV-infected persons to antifungal ducts under exogenous conditions in Iran].Journal of Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Volume 70, Number 2, May 2012,pages 96-103.
30. Asghari A, Rakhsh N, Madani M.[Antifungal effect of silver nanoparticles on candidate factors of vulvovaginitis in laboratory conditions].Iranian Journal of Microbiology.Year 9, No. 3, Autumn 2015.