Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره هفتم، مهر ۹۵
صفحه ۱۰ الی ۱۹

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثرات ضدقارچی فلوکونازول کونژوگه با نانوذرات طلا، بر روی ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول جداشده از بیماران مبتلا به عفونت مزمن ولوواژینیت

مهرداد معماریان[1*]، علی جوادی[1]، روح‌الله فاتح[2]

چکیده

زمینه و هدف: تعدادی از زنان مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی، به موارد مزمن و عودکننده بیماری که بر کیفیت زندگی آنها تأثیر زیادی دارد دچار می‌شوند. از طرفی، افزایش استفاده از داروهای ضدقارچی، به‌ویژه داروهای آزولی در درمان کاندیدیازیس مزمن، عامل مهمی در بروز مقاومت دارویی در بین ایزوله‌های کاندیدایی جداشده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضدکاندیدایی فلوکونازول کونژوگه با نانوذرات طلا جهت دستیابی به داروی مناسب برای درمان بیماران مبتلا به واژینیت کاندیدایی، به‌ویژه موارد مزمن بیماری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پس از جمع‌آوری ۳۰۰ نمونه سوآب واژینال، کشت و جداسازی کلنی‌های اولیه و تعیین گونه کاندیدایی؛ با روش دیسک دیفیوژن، ایزوله‌های مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* جدا شدند. در نهایت، اثرات ضدقارچی کونژوگه فلوکونازول با نانوذرات طلا در مقایسه با داروی فلوکونازول با استفاده از روش میکرودایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه تنها یک سویه مقاوم به داروی فلوکونازول (MIC برابر با ۶۴ میکروگرم برمیلی‌لیتر) از بیماران جدا شد. نتایج تست حساسیت دارویی نشان داد این سویه نسبت به کونژوگه فلوکونازول با نانوذرات طلا حساس بوده است (MIC برابر با ۲ میکروگرم برمیلی‌لیتر).

نتیجه‌گیری: اثرات ضدکاندیدایی بسیار مطلوب کونژوگه طلا با فلوکونازول بر روی سویه مقاوم به فلوکونازول، این امیدواری را ایجاد کرد که بتوان در آینده به ترکیب مناسب با اثرات ضدکاندیدایی فوق‌العاده دست یافت.

کلید واژه‌ها: واژینیت عودکننده؛ کاندیدا آلبیکنس؛ نانوذرات؛ فلوکونازول.

[1]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

[2]گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
مهرداد معماریان، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mehr.memarian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Memarian M, Javadi A, Fateh R. Antifungal effects of gold nanoparticles conjugated fluconazole against fluconazole resistant strains of candida albicans isolated from patients with chronic vulvovaginitis. Qom Univ Med Sci J 2016;10(7):10-19. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدایی، عفونت شایعی است که تقریباً ۸۰٪ زنان بالغ در طول دوران زندگی خود، حداقل یک‌مرتبه به آن مبتلا می‌شوند. حاملگی، استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری مانند IUD و درمان طولانی‌مدت با آنتی‌بیوتیک‌ها، ازجمله ریسک فاکتورهای مهم در رشد بیش از حد عوامل کاندیدایی در واژن و بروز واژینیت کاندیدایی هستند. به‌طور تقریبی در ۸۰٪ موارد، عامل بیماری مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بوده؛ درحالی‌که گونه‌های دیگری از قبیل *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* نیز به‌عنوان عامل بیماری گزارش شده‌اند (۱). خارش واژن از مشخص‌ترین علامت واژینیت کاندیدایی است، علائمی چون سوزش ادرار و افزایش ترشحات واژن نیز از موارد شایع است. از علائم بالینی بیماری می‌توان به ادم و قرمزی ولو (Vulva)، اشاره کرد و پلاک‌های دلمه‌ای شکل، چسبیده به دیواره واژن نیز مشاهده شده است (۲).

تعدادی از زنان به موارد مزمن و عودکننده واژینیت کاندیدایی یا RVVC (Recurrent Vulvovaginal Candidiasis) مبتلا می‌شوند که بر کیفیت زندگی آنها مؤثر بوده و تأثیر بسیار زیادی نیز در انتقال بیماری به شرکای جنسی آنان دارد. به‌نظر می‌رسد درمان ناکامل عفونت و یا کسب عفونت مجدد از شریک جنسی، دو عامل مهم در ابتلای افراد به اشکال مزمن بیماری است (۳). به‌ندرت عفونت RVVC ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* به‌واسطه مقاومت دارویی است و به‌نظر می‌رسد عوامل دیگری مانند آلودگی مدفوعی ناحیه واژن که به‌کرات رخ می‌دهد، بیشتر در ارتباط با عفونت ناشی از گونه آلبیکنس باشد (۴). گزارشهای مختلفی وجود دارد که نشان‌دهنده مقاومت گونه‌های کاندیدایی به داروهای ضدقارچی است (۷-۵). درمان طولانی‌مدت و استفاده بی‌رویه از داروهای ضدقارچی، از مهم‌ترین عوامل مقاومت ایزوله‌های کاندیدایی جداشده از بیماران مبتلا به عفونت مزمن ولوواژینیت نسبت به داروهای آزولی رایج است (۸). لذا دستیابی به داروهایی با کارآیی بیشتر، امری ضروری به‌نظر می‌رسد. نانوذرات‌ها اجزای کوچکی با قطری بین ۱۰۰-۱ نانومتر هستند. نانوذرات‌ها به قدری کوچکند که می‌توان گفت بی‌نظمی چندانی در آنها وجود ندارد و به‌علت داشتن مساحت سطحی بالا، در علوم مختلف نیز استفاده می‌شوند. همچنین اندازه ذرات و خصوصیات سطحی آنها باعث شده تا کنترل رهاسازی دارو به سایت هدف آسان شود که سبب افزایش اثرات دارو می‌شود (۹). ازجمله نانوذراتی‌که کاربردهای فراوانی در زمینه‌های نانوپزشکی دارد، نانوذرات طلا می‌باشد.

از کاربردهای مهم نانوذرات طلا در زمینه‌های بیومدیکال، استفاده از آن در Photo Thermal Therapy است که جهت تخریب تومورها می‌توان از آن استفاده کرد (۱۱،۱۰). از طرفی، تحقیقات مختلف، به‌ویژه در زمینه داروهای ضدباکتریایی نشان داده است نانوذرات طلا متصل‌شده به داروهای ضدمیکروبی در مقایسه با همان داروها به تنهایی، دارای فعالیت ضدمیکروبی بهتری می‌باشد (۱۴-۱۲).

با توجه به اینکه تحقیقات بسیار اندکی در زمینه کونژوگه‌های مختلف داروهای ضدقارچی با نانوذرات طلا صورت گرفته است، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدقارچی داروی فلوکونازول کونژوگه‌شده با نانوذرات طلا بر ضدایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی انجام گرفت.

روش بررسی

در طی مدت یک‌سال و نیم (از مهرماه سال ۱۳۹۲ تا اسفندماه سال ۱۳۹۳)، ترشحات واژن ۳۰۰ نفر از زنان مشکوک (با داشتن علائمی مثل خارش، سوزش، درد، تغییر در ترشحات، درد در هنگام مقاربت، قرمزی، التهاب و ادم در دستگاه تناسلی) با استفاده از سوآب استریل جمع‌آوری شد. سوآب‌ها به‌طور اولیه روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شدند. برای جداسازی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* از سایر گونه‌های کاندیدایی، کلنی‌های مخمری رشدکرده بر روی محیط سابورو دکستروز آگار، در محیط کاندیدا کروم آگار کشت داده شدند و تست‌های تولید جرم تیوب در سرم تازه و کلامیدوکونیدی در روی محیط کورن‌میل آگار حاوی توئین ۸۰ نیز انجام گرفت. درنهایت، برای تشخیص قطعی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، تست جذب قند با استفاده از کیت API20C انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

برای افتراق گونه‌های مقاوم به فلوکونازول *کاندیدا آلبیکنس* از گونه‌های حساس، روش دیسک دیفیوژن (طبق دستورالعمل CLSI M44-A2) با استفاده از دیسک ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول (سیگما، آمریکا) به‌کار برده شد (۱۵).

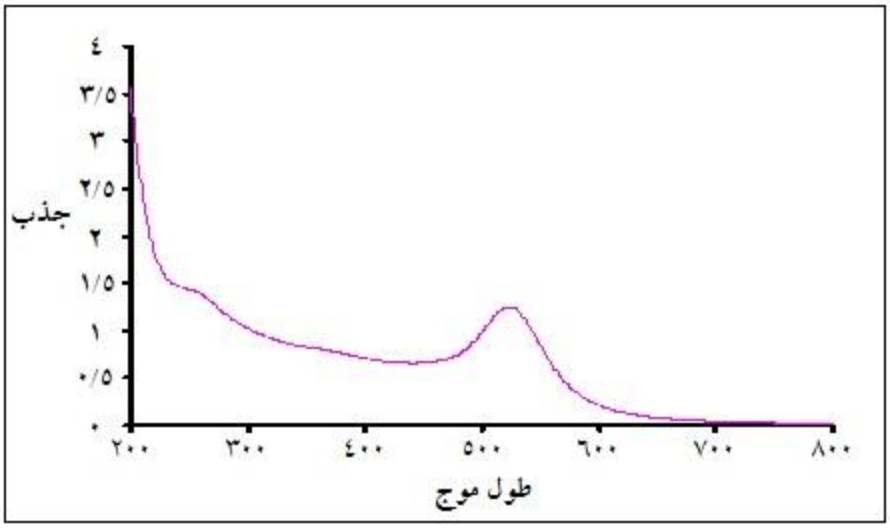
از کشت تازه و ۲۴ ساعته از گونه‌هایی که بر روی سابرودکستروز آگار (مرک، آلمان) کشت داده شده بودند در ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد و پس از ورتکس با سوآب استریل، سوسپانسیون نمونه‌ها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) (حاوی ۲٪ گلوکز و ۰/۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر متیلن بلو) کشت انبوه داده شد.

پس از خشک شدن سطح پلیت، دیسک فلوکونازول با پنس استریل بر روی کشت گذاشته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۲-۳۰ درجه در انکوباتور (ایران تجهیز، ایران) گرماگذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک با خط‌کش، اندازه‌گیری و حساسیت و مقاومت ایزوله‌ها به فلوکونازول (طبق جدول شماره ۱) ثبت گردید. در ادامه، سویه‌های مقاوم از سویه‌های حساس افتراق داده شدند (سویه‌های مقاوم فاقد هاله عدم رشد در اطراف دیسک بودند.) از سویه *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231 جهت کنترل مثبت استفاده گردید.

جدول شماره ۱: استانداردهای CLSI برای داروی فلوکونازول به روش انتشار از دیسک

دیسک دارویی	استانداردهای CLSI (دیسک دیفیوژن)		
	مقاوم	وابسته به دوز	حساس
فلوکونازول ۲۵	≤۱۴ میلی‌متر	۱۸-۱۵ میلی‌متر	≥۱۹ میلی‌متر

از واکنش احیای شیمیایی (Turkevich Method) جهت تهیه نانوذرات طلا استفاده شد (۱۶)؛ بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از ترکیب HAuCl4 ۱ میلی‌مولار (نمک طلا ۵۶٪) داخل فلاسک تمیز ریخته شد و سپس روی دستگاه Hot plate قرار گرفت. در ادامه، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر تری سیترات سدیم ۰/۰۱ مولار (به‌صورت قطره قطره) به همراه ۱۸/۵ میلی‌لیتر آب ۲ بار تقطیر، به محلول اضافه و در دستگاه جوش قرار گرفت. بعد از تغییر رنگ محلول از رنگ زرد به رنگ قرمز، محلول مورد نظر در ظرف تیره در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. از دستگاه اسپکتروفتومتری (شرکت Varian مدل Cary 100) جهت طیف‌سنجی نانوذرات استفاده گردید. محلول مورد نظر درون کووت ریخته شد و ماکزیمم جذب (در طول موج ۵۲۰ نانومتر) (نمودار شماره ۱) به همراه منحنی مربوطه ترسیم شد. از طریق عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (مدل LEO912-AB ساخت شرکت LEO)، شکل نانوذرات مشخص گردید. با استفاده از دستگاه Dynamic Light Scattering (Nano-ZS, Malvern)، پراکندگی نانوذرات (از نظر اندازه و میانگین اندازه نانوذرات)، ۱۰ نانومتر محاسبه شد (شکل شماره ۱) (نمودار شماره ۲).

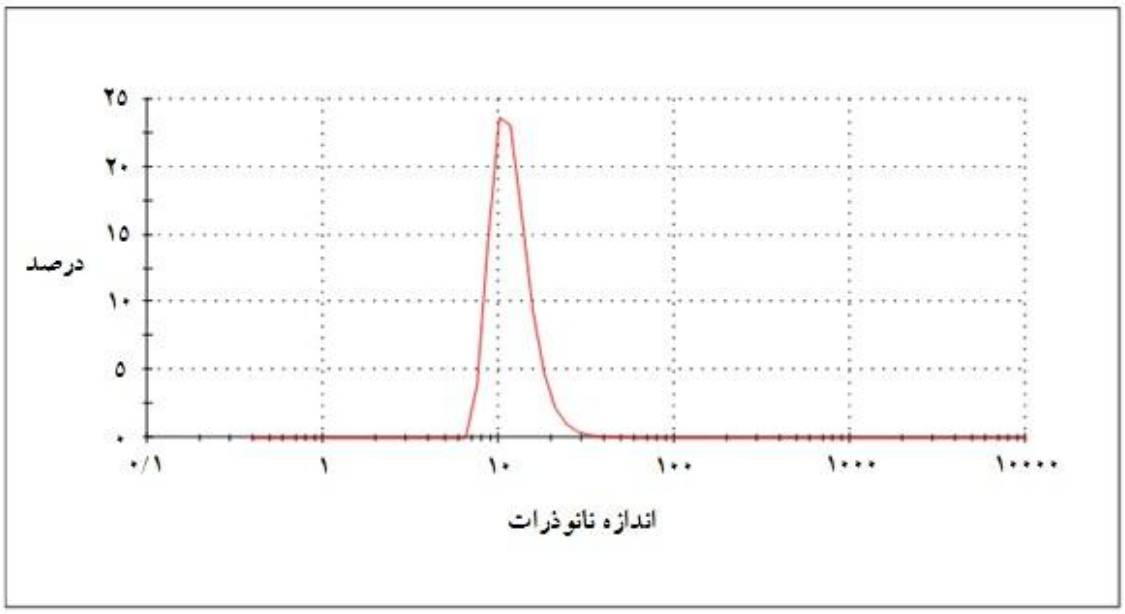


نمودار شماره ۱: منحنی حاصل از اسپکتروفتومتری نانوذرات طلا

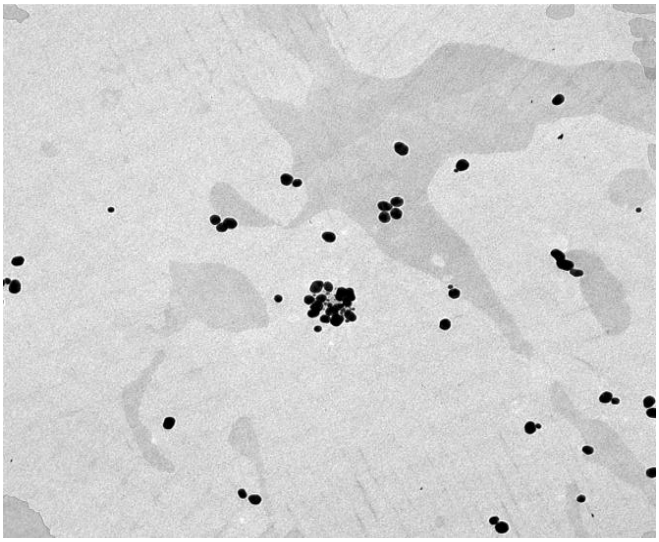
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016



نمودار شماره ۲: محاسبه پراکندگی نانوذرات براساس اندازه به‌وسیله دستگاه DLS



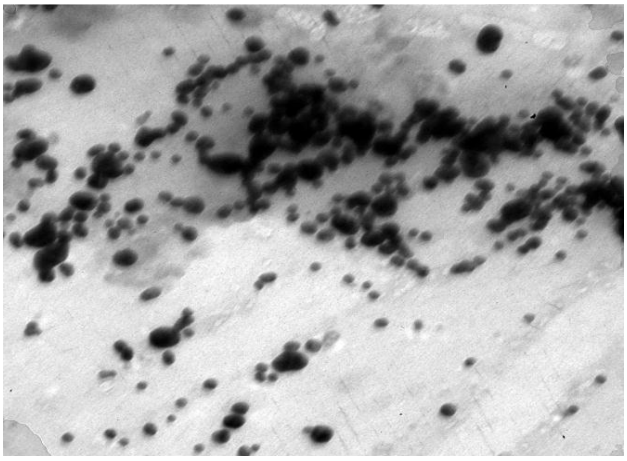
شکل شماره ۱: شکل الکترونی نانوذرات طلا

۱۰ میلی‌لیتر از محلول نانوذرات طلا در آب، درون ارلن ریخته شد و ۵ میلی‌لیتر از محلول آبی ۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر فلوکونازول به‌آن اضافه گردید. محلول به مدت ۲ ساعت روی استیرر قرار گرفت و پس از مشاهده تغییر رنگ، دستگاه خاموش شد. واکنش به‌مدت ۷ روز زیرنظر گرفته شد و پس از اطمینان از ثبات واکنش، محلول‌ها در ظروف تیره در ۴ درجه سانتیگراد درون یخچال نگهداری شدند (۱۷).اثبات کونژوگاسیون نانوذرات طلا با فلوکونازول، از طریق عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (بزرگنمایی ۵۰۰۰۰ برابر) صورت گرفت. حالت تجمعی در وضعیت کونژوگاسیون مشاهده گردید (شکل شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016



شکل شماره ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی حالت کونژوگه

محلول کونژوگه و آزاد فلوکونازول به همراه نانوذره، به تنهایی سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) شد. در ادامه، مایع رویی دور ریخته شد و پس از خشک‌شدن رسوب تحت شرایط خلاء همراه وکیوم، مقداری از پودر با مقداری پتاسیم بروماید (KBr)، مخلوط و تحت فشار قرص آن تهیه گردید، سپس روی سل مخصوص دستگاه قرار گرفت و سل درون دستگاه FT-IR (مدل WQF 510 شرکت Rayleigh ساخت کشور چین) گذاشته شد. در ادامه، نمودار مربوط به ساختار آلی آنتی‌بیوتیک پس از کونژوگاسیون و نانوذره ترسیم شد.

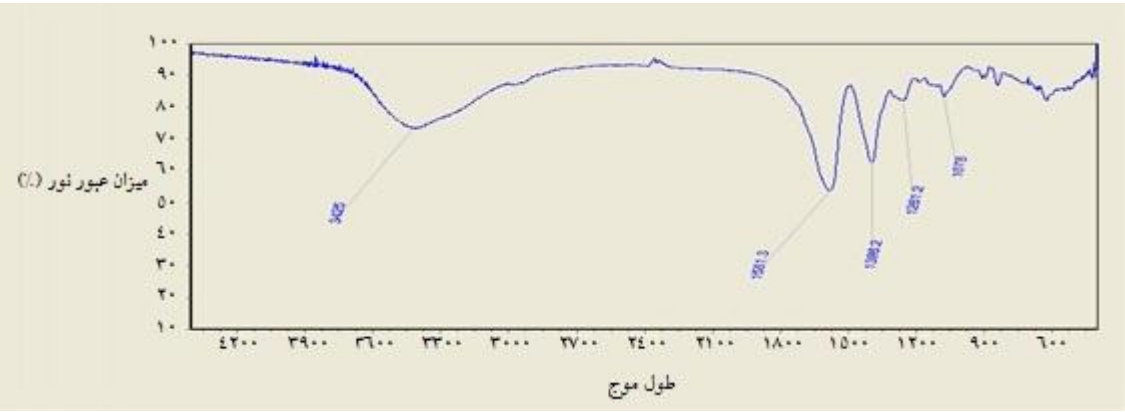
به‌منظور بررسی اثرات ضدقارچی کونژوگه طلا با فلوکونازول بر روی سویه‌های مقاوم *کاندیدا آلبیکنس*، از دیسک‌های بلانک (آغشته به ۲۰ میکرولیتر حالت کونژوگه دارو با نانوذرات طلا)، همچنین نانوذرات طلا و فلوکونازول به تنهایی استفاده گردید. میزان MIC هریک از ترکیبات (کونژوگه فلوکونازول، نانوذرات طلا و فلوکونازول) نسبت به سویه مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از بیماران مبتلا به واژینیت (طبق دستورالعمل CLSI M27-A3)، تعیین و گزارش شد (۱۸).

از هریک از ترکیبات، رقت سریال در غلظت ۲۵۶ میکروگرم برمیلی‌لیتر تا ۰/۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر، تهیه و میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون چاهک‌های ۱۰-۱ میکروپلیت ریخته شد.

چاهک ۱۱ و ۱۲ میکروپلیت به ترتیب به‌عنوان کنترل‌های مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. بعد از تهیه سوسپانسیون قارچی که حاوی $۰/۵-۲/۵\times۱۰^{۳}$ سلول مخمری در هر میلی‌لیتر بود، میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هریک از چاهک‌های حاوی غلظت‌های مختلف از ترکیبات اضافه شد. پس از گرماگذاری، میزان MIC به طریق چشمی تعیین گردید.

یافته‌ها

با انجام FT-IR از نانوذرات و ترکیبات فلوکونازول به‌تنهایی و ترکیب با نانوذرات طلا؛ تغییرات در حالت کونژوگه فلوکونازول مشاهده گردید، به‌طوری‌که در محدوده ۳۰۰۰-۲۰۰۰، حذف برخی پیک‌ها و نیز در محدوده ۱۸۰۰-۱۲۰۰ نیز تغییرات دیده شد (نمودار شماره ۳ و ۴).



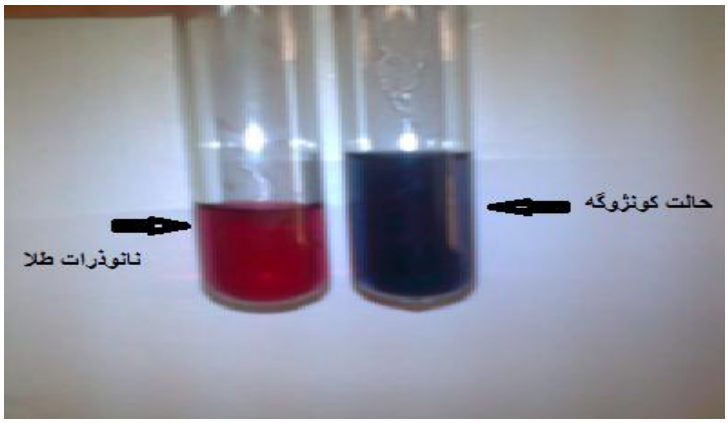
نمودار شماره ۳: FT-IR از نانوذرات طلا

www.SID.ir

Archive of SID

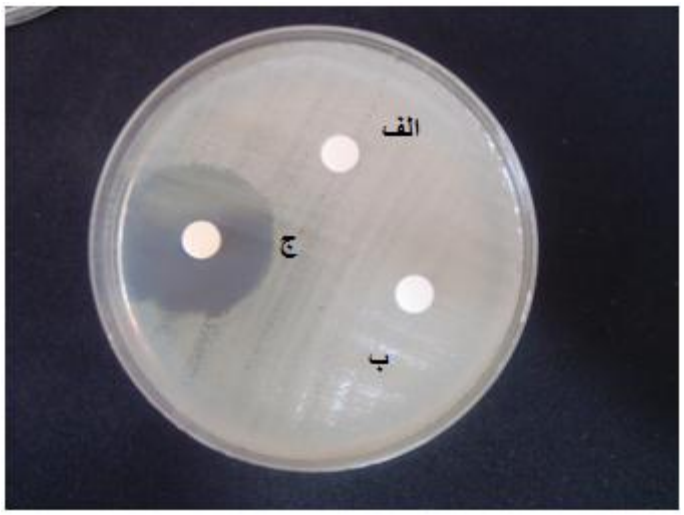
نمودار شماره ٤: FT-IR از فلوکونازول آزاد و کونژوگه با نانوذرات طلا (فلش بالا مربوط به فلوکونازول و فلش پایین مربوط به حالت کونژوگه آن با نانوذرات طلا

در اثر سنتز احیای شیمیایی، محلول نانوذرات طلا به رنگ قـرمز و محلول کونژوگه آن به رنگ بنفش درآمد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: محلول‌های نانوذرات طلا و کونژوگه آن با فلوکونازول، پس از سنتز به طریق احیای شیمیایی

از بین ۳۰۰ نمونه مشکوک به واژینیت کاندیدایی، ۶۵ سویه *کاندیدا آلبیکنس* جدا شد که با استفاده از تست دیسک دیفیوژن مشخص گردید از بین این سویه‌ها، تنها یک سویه مقاوم به فلوکونازول و ۶۴ سویه حساس به فلوکونازول می‌باشند. نتایج دیسک دیفیوژن این سویه مقاوم با استفاده از دیسک‌های آغشته به فلوکونازول، نانـوذرات طلا و کـونـژوگـه فلـوکـونازول با نانوذرات طلا، نشان‌دهنده مقاومت این سویه نسبت به فلوکونازول (شکل شماره ۴- الف) و نانوذرات طلا (شکل شماره ۴- ب)، به‌تنهایی بود، درحالی‌که هاله عدم رشدی به میزان ۳۰ میلی‌متر در اطراف دیسک آغشته به ترکیب فلوکونازول کونژوگه با نانوذرات طلا (شکل۴- ج) مشاهده گردید.



شکل شماره ٤: نتایج تست دیسک دیفیوژن سویه مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* با سه ترکیب فلوکونازول: (الف) نانوذرات طلا، (ب) فلوکونازول و (ج) کونژوگه با نانوذرات طلا.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

نتایج به‌دست‌آمده از روش میکرودایلوشن، نشان‌دهنده کاهش چشمگیر میزان MIC ترکیب فلوکونازول کونژوگه با نانوذرات طلا در مقایسه با هریک از ترکیبات به تنهایی بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: میزان MIC هریک از ترکیبات مورد استفاده در این مطالعه بر روی سویه مقاوم *کاندیدا آلبیکنس*

سویه مقاوم *کاندیدا آلبیکنس*	MIC (برحسب میکروگرم برمیلی‌لیتر)
فلوکونازول	۶۴
نانوذرات طلا	≥۲۵۶
فلوکونازول کونژوگه	۲

بحث

گونه‌های کاندیدا، ۲۵-۲۰٪ از موارد واژینیت را تشکیل می‌دهند و عامل بیش از ۷۰٪ موارد واژینیت کاندیدایی، گونه *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد. امروزه، جهت درمان واژینیت کاندیدایی از داروهای نیستاتین، کتوکونازول و فلوکونازول استفاده می‌شود. این مخمر در عفونت‌های مزمن برای زنان مشکل‌زا بوده و از آنجاکه در این حالت به داروهای واژینال ضدقارچی مقاوم می‌شود، درمان در چنین مواردی طولانی و پرهزینه است (۲،۱).

نانوذرات‌ها، اجزای پراکنده یا مجتمعی هستند که اندازه‌ای بین ۱۰۰-۱ نانومتر دارند. علت اصلی استفاده از نانوذرات در سیستم‌های تحویل دارو، کنترل اندازه نانوذرات، ویژگی سطحی آنها و توانایی رهاسازی دارو به جایگاه هدف می‌باشد. نانوذرات طلا با داشتن ویژگی سطحی مناسب و سنتز آسان‌تر، به‌عنوان یک گزینه مناسب جهت حمل داروها به شمار می‌آید. علاوه بر این، فعالیت ضدمیکروبی آن نیز شناخته شده است (۹).

در مطالعه حاضر، از ۳۰۰ نمونه واژینال با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و محیط کروم آگار، ۶۵ مورد *کاندیدا آلبیکنس* (۲۱/۶٪) جدا شد که از بین آنها، تنها یک مورد (۱/۵۴٪) به داروی فلوکونازول مقاوم بود، لذا با توجه به اهداف تعریف‌شده در این طرح، تنها به بررسی اثرات ضدکاندیدایی کونژوگه نانوذرات طلا با فلوکونازول بر روی یک گونه مقاوم (*کاندیدا آلبیکنس*) پرداخته شد. در مطالعات مختلفی به بررسی اثرات مهاری کونژوگه طلا و ترکیبات ضدمیکروبی بر روی میکروارگانیسم‌ها، به‌ویژه باکتری‌ها پرداخته شده است. درمطالعه‌ای‌که توسط Bhattacharya و همکاران (سال ۲۰۱۲) انجام شد، اثرات ضدباکتریایی سه داروی آمپی‌سیلین، استرپتومایسین و کانامایسین در حالت کونژوگه با نانوذرات طلا بر روی سه گونه باکتری *اشرشیاکلی*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص گردید کونژوگه این داروها با نانوذرات طلا، اثرات ضدباکتریایی بهتری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها به حالت آزاد نشان می‌دهند (۱۹).

در مطالعه محمدفیاض و همکاران (سال ۲۰۱۱)، اثرات ضدباکتریایی ونکومایسین کونژوگه با نانوذرات طلا بر روی ایزوله VRSA مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه میزان MIC داروی ونکومایسین کونژوگه با طلا، ۸ میکروگرم برمیلی‌لیتر به دست آمد که مقایسه آن با میزان MIC ونکومایسین در حالت آزاد (۵۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر)، نشان‌دهنده اثرات ضداستافیلوکوکی چشمگیر کونژوگه دارویی بود (۲۰). Zawrah و همکاران نیز در مطالعه خود (سال ۲۰۱۱)، با بررسی تأثیر نانوذرات طلا بر روی اثر سیپروفلوکساسین و داروی ضدقارچی فلوکونازول بر ضدپاتوژن‌های غذایی و برخی قارچ‌ها نشان دادند فعالیت ضدمیکروبی کونژوگه سیپروفلوکساسین بر *ضدسودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* افزایش داشته و در تمامی آنها قطر هاله عدم رشد در حالت کونژوگه نسبت به حالت آزاد بیشتر بوده است. همچنین در این مطالعه مشخص گردید فلوکونازول کونژوگه‌شده با ۴۰ میکرولیتر نانوذرات طلا دارای بهترین اثرات ضدقارچی برضدگونه‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *کاندیدا آلبیکنس* و *آسپرژیلوس فلاووس* است. قطر هاله عدم رشد برای هریک از قارچ‌ها در این مطالعه به ترتیب ۱۴، ۱۳ و ۱۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد، همچنین پراکندگی نانوذرات طلا، ۲۲-۱۱ نانومتر به دست آمد و طول موج ماکزیمم جذب به‌وسیله اسپکتروفتومتری، ۵۳۰ نانومتر تعیین شد، لذا بررسی در مورد تغییرات ساختاری دارو با FT-IR انجام نگرفت (۲۱). در مطالعه حاضر، ماکزیمم طول موج جذب، ۵۲۰ نانومتر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

بیشترین پراکندگی با دستگاه DLS مربوط به اندازه ۱۰ نانومتر تعیین شد. تغییرات ساختاری در فلوکونازول در هنگام کونژوگاسیون با FT-IR نیز نشان از حذف برخی از پیک‌ها در هنگام اتصال با نانوذرات طلا بود. مطالعات اندکی در زمینه کونژوگه نانوذرات طلا و داروهای ضدقارچی صورت گرفته، اما در رابطه با ترکیب نانوذرات نقره با داروهای ضدقارچی، مطالعات بیشتری انجام شده است. Monteiro و همکاران (سال ۲۰۱۳) نشان دادند ترکیب نقره با داروی نیستاتین بر روی بیوفیلم تشکیل‌شده توسط گونه‌های مختلف کاندیدایی، اثرات سینرژیستی دارد که بسته به گونه قارچ و غلظت داروی مورد استفاده، متفاوت است (۲۲). Gajbhiye و همکاران (سال ۲۰۰۹)، اثرات ضدقارچی نانوذرات نقره به‌دست‌آمده از قارچ‌ها در ترکیب با فلوکونازول بر ضدقارچ‌های بیماری‌زای *فوما*، *فوزاریوم*، *ترایکودرما* و *کاندیدا آلبیکنس* را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد ترکیب نانوذرات نقره و فلوکونازول دارای بیشترین اثر بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* است، درحالی‌که بر روی قارچ *فوزاریوم* تأثیری ندارد (۲۳). در این مطالعه از روش واکنش احیای شیمیایی (Turkevich Method) برای سنتز کونژوگه طلا استفاده شده است. این روش در مقایسه با سایر روش‌های تهیه نانوذرات طلا، بسیار ساده و در دسترس بوده و برای تهیه نانوذرات طلای کروی به کار گرفته می‌شود که در نهایت، ذراتی با اندازه ۲۰-۱۰ نانومتر به دست می‌آید.

در مطالعه حاضر، اثرات بسیار قابل‌توجهی از فلوکونازول کونژوگه با نانوذرات طلا بر روی *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول مشاهده گردید و مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از فلوکونازول، نانوذرات طلا و کونژوگه فلوکونازول با نانوذرات طلا، حاکی از کاهش چشمگیر میزان MIC داروی کونژوگه (۲ میکروگرم برمیلی‌لیتر) در مقایسه با MIC دارو به حالت آزاد (۶۴ میکروگرم برمیلی‌لیتر) بود. از محدودیت‌های این مطالعه، می‌توان به پایداری کم کونژوگه نانوذرات طلا و فلوکونازول اشاره کرد، لذا تحقیقات بیشتر در زمینه افزایش پایداری این کونژوگه دارویی، لازم و ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه اثرات ضدکاندیدایی بسیار مطلوب کونژوگه طلا با فلوکونازول بر روی سویه مقاوم به فلوکونازول را نشان داد و این امیدواری را ایجاد کرد که با رفع محدودیت‌های پیش‌رو و نیز مطالعات بیشتر با استفاده از سویه‌ها و گونه‌های مختلف قارچی، بتوان به ترکیب مناسب با اثرات ضدکاندیدایی فوق‌العاده جهت درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های کاندیدایی، به‌ویژه بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به دارو دست یافت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی (به شماره ۲۷۲۰) بوده که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم به انجام رسیده است. بدینوسیله از مسئولان دانشگاه که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم آورند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Diba K, Namaki A, Ayatolahi H, Hanifian H. Rapid identification of drug resistant Candida species causing recurrent vulvovaginal candidiasis. Med Mycol J 2012;53(3):193-8.

2. Falahati M, Fateh R, Sharifinia S. Anti-Candidal effect of shallot against chronic candidiasis. Iranian J Pharmacol Ther 2011;10:49-51.

3. Ringdahl EN. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am Fam Physician 2000;61(11):3306-12.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Diba K, Namaki A, Ayatolahi H, Hanifian H. Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of candida species causing vulvovaginal candidiasis and recurring vulvovaginal candidiasis. Iranian J Med Microbiol 2014;8(3):45-50. [Full Text in Persian]

5. Kamali F, Gharibi T, Naiemi B, Afshary P. Treatment of candida vaginitis: Comparison of single and sequential dose of fluconazole. Iran South Med J 2003;6(1):25-30. [Full Text in Persian]

6. Kariman NS, Shafaei Z, Afrakhteh M, Valaei N, Ahmadi M. Comparing fluconazole and clotrimazole in treatment of Candida albicans vaginiti. Behbood 2002;14(6):9-16. [Full Text in Persian]

7. Momeni A, Shadzi S, Ghadeganipour M, Asilian A, Khorsandi R. The effect of itraconazole on treatment of vaginal candidiasis. J Kerman Univ Med Sci 1995;2(2):71-7. [Full Text in Persian]

8. Salehei Z, Seifi Z, Zarei Mahmoudabadi A. Sensitivity of vaginal isolates of Candida to eight antifungal drugs isolated from Ahvaz, Iran. Jundishapur J Microbiol 2012;5(4):574-7.

9. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. Trop J Pharm Res 2007;5(1):561-73.

10. Jain KP, El-Sayed HI, El-Sayed AM. Au nanoparticles target cancer. Nanotoday 2007;2(1):18-29.

11. El-Sayed HI, Huang X, El-Sayed AM. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. Cancer Lett 2006;239(1):129-35.

12. Burygin GL, Khlebtsov BN, Shantrokha A, Dykman LA, Bogatyrev VA, Khlebtsov NG. On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles. Nanoscale Res Lett 2009;4(8):794-801.

13. Saha B, Bhattacharya J, Mukherjee A, Ghosh AK, Ranjan Santra C, Dasgupta AK, et al. In vitro structural and functional evaluation of gold nanoparticles conjugated antibiotics. Nanoscale Res Lett 2007;2(12):614-22.

14. Selvaraj V, Alagar M. Analytical detection and biological assay of antileukemic drug 5-fluorouracil using gold nanoparticles as probe. Int J Pharm 2007;337(1-2):275-81.

15. Clinical and Laboratory Standards Institute. M44-A2: Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline. 2nd ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

16. Turkevich J. Colloidal gold. Part II. Gold Bulletin 1985;18(4):125-31.

17. Grace AN, Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles- A brief study. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp 2007;297(1-3):63-70.

18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3rd ed. CLSI document. M27-S3 2008. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

19. Bhattacharya J, Jasrapuria S, Sarkar T, Ghosh Moulick R, Dasgupta AK. Gold nanoparticle-based tool to study protein conformational variants: Implications in hemoglobinopathy. Nanomedicine 2007;3(1):14-9.

20. Fayaz MA, Girilal M, Mahdy SA, Somsundar SS, Venkatesan R, Kalaichelvan P. Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: A different perspective for development of anti VRSA agents. Proc Biochem 2011;46(3):636-41.

21. Zawrah MF, Abd El-Moez S. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. Life Sci J 2011;8(4):37-44.

22. Monterio DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliviera R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against Candida albicans and Candida glabrata biofilms. Mycoses 2013;56(6):672-80.

23. Gajbhiye M, Kesharwani J, 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):382-6.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Qom Univ Med Sci 2016 September

Original Article

Antifungal Effects of Gold Nanoparticles Conjugated Fluconazole against Fluconazole Resistant Strains of Candida albicans Isolated From Patients with Chronic Vulvovaginitis

Mehrdad Memarian[1*], Ali Javadi[1], Roohollah Fateh[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

[2]Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

[*]Corresponding Author:
Mehrdad Memarian,
Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email: mehr.memarian@yahoo.com

Received: 4 Apr, 2016

Accepted: 26 Apr, 2016

Abstract

Background and Objectives: A number of women with volvuvaginal candidiasis suffer from certain chronic and recurrent types of this infection that affect their quality of life. Meanwhile, increased use of antifungal drugs, especially azoles, for treatment of chronic candidiasis is an important factor for incidence of drug resistance in Candida isolates from patients with vulvovaginal candidiasis. The aim of this study was to investigate anticandidal effects of gold nanoparticles conjugated fluconazole to develop better drugs for treatment of patients with candidal vaginitis, especially its chronic type.

Methods: After collection of 300 vaginal swab specimens and culture and isolation of primary colonies and determination of Candida species, fluconazole resistant strains of *Candida albicans* were detected using disc diffusion. Finally, antifungal effects of gold nanoparticles conjugated fluconazole and fluconazole were compared by broth microdilution.

Results: Only one fluconazole resistant strain of *C. albicans* was isolated from patients (MIC=64µg/ml). The results obtained from drug susceptibility test showed that this strain was sensitive to gold nanoparticles conjugated fluconazole (MIC=2µg/ml).

Conclusion: Given the optimal anticandidal effects of gold nanoparticles conjugated fluconazole on resistant strains of *C. albicans*, a suitable compound with great anticandidal properties may be achieved in the future.

Keywords: Recurrent vaginitis; *Candida albicans*; Nanoparticles; Fluconazole.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:37 IRST on Saturday October 1st 2016

www.SID.ir