(مقالهٔ پژوهشی)

ارزیابی فعالیت ضدقارچی نانوذرهٔ اکسید روی بر علیه بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس با روش رنگ

سیده صدیقه حسینی[۱*]، حمیدرضا جوشقانی[۲]، مهدی اسکندری[۳]

۱-کارشناسی ارشد گروه قارچ‌شناسی پزشکی.
۲- دانشیار گروه بیوشیمی.
۳- دانشجوی دوره دکترای مهندسی نانو مواد.

۱- گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکدهٔ علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان و مرکز تحقیقات بیوشیمی و اختلالات متابولیک، دانشکدهٔ پیراپزشکی و بهداشت دانشگاه علوم پزشکی گرگان، ایران.
۳- دانشکدهٔ فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
سیده صدیقه حسینی؛ گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکدهٔ علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
تلفن: ۲۲۳۲۹۹۴- ۰۰۹۸۱۷۱
Email: hoseini_se@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر شیوع بیماری‌های قارچ‌های فرصت طلب افزایش چشم‌گیری یافته است. کاندیدا دابلینسیس یکی از پاتوژن‌های قارچی معمول کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح و وسایل پزشکی است. هدف از این مطالعه، ارزیابی فعالیت مهاری نانوذرهٔ اکسید روی بر علیه تشکیل بیوفیلم توسط کاندیدا دابلینسیس با روش رنگ‌سنجی MTT می‌باشد.

روش بررسی: در این بررسی نانوذرهٔ اکسید روی با استفاده از روش سل- ژل تهیه گردید، اندازه و نوع ذرات به ترتیب به وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و پراش اشعهٔ ایکس(XRD) تعیین شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد با روش میکروبراث دایلوشن انجام شد. بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس (DSY 1024) بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد تشکیل و اثر بازدارندگی نانوذرهٔ ZnO، SDS و داروی فلوکونازول به عنوان کنترل مثبت بر روی بیوفیلم کاندیدا توسط احیای نمک تترازولیوم MTT ارزیابی شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری t-test و نرم‌افزار SPSS تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که حداقل غلظت مهارکنندهٔ نانوذرهٔ ZnO، SDS و فلوکونازول به ترتیب: ۹/۲۵، ۰/۰۲ ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. قدرت مهارکنندگی چسبندگی بیوفیلم در حضور نانوذرهٔ ZnO، SDS و فلوکونازول، معادل بیش از دو برابر غلظت MIC برای مهار رشد بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، سنتز نانوذرهٔ ZnO با روش شیمیایی نشان داد که دارای خاصیت ضد قارچی است. از این رو، می‌تواند راه‌کاری جدید جهت پیش‌گیری از تشکیل بیوفیلم کاندیدا به ویژه بیوفیلم‌های مرتبط با ابزارهای پزشکی باشد.

کلید واژگان: کاندیدا دابلینسیس، بیوفیلم، نانوذرهٔ اکسید روی، *MTT*.

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/٤/۲۹ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۱/۲/۲۵ اعلام قبولی: ۱۳۹۱/٤/۲۵

مقدمه

کاندیدا دابلینسیس از محوطهٔ دهانی افراد HIV^+ و به ویژه مبتلایان به ایدز و اغلب همراه با دیگر گونه‌های کاندیدا به خصوص آلبیکنس جدا شده است (۱). با وجود این باید توجه داشت که کاندیدا دابلینسیس را می‌توان از محوطهٔ دهانی حاملین سالم و افراد HIV^- مبتلا به کاندیدیازیس دهانی (برفک) شامل افراد بدون بیماری‌های زمینه‌ایی و مبتلایان به دیابت جدا نمود. کاندیدا دابلینسیس یکی از مخمرهای مسبب سپتیسمی در گیرندگان پیوند و بیماران نوتروپنی، سرطان معده، افراد تحت درمان آنتی‌بیوتیک-های وسیع‌الطیف و بیماران مبتلا به عفونت HIV می‌باشد. تصور می‌شود که علت جدا شدن دابلینسیس از محوطهٔ دهانی افراد HIV^+ و مبتلایان به ایدز بی‌ارتباط با مصرف داروهای متعدد ضد قارچی توسط این افراد در طول دههٔ ۱۹۹۰ نباشد. اما تحقیقات نشان داده است که این گونه نیز نسبت به اکثر داروهای ضد قارچی مرسوم و داروهای جدید تحت بررسی حساس می‌باشد (۱).

امروزه استفاده از کاتترهای وریدی یا ادراری، دریچه-های پروستتیک، مفاصل مصنوعی و پروتزها و سایر ایمپلنت‌های پزشکی مرسوم شده است (۲). میکروارگانیسم-های مختلف که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند، می‌توانند روی این مواد چسبیده، رشد کرده و با کلونیزاسیون و ایجاد عفونت مشکلات خاصی را ایجاد کنند. بیوفیلم در واقع به معنای اتصال، تجمع و تراکم پیچیدهٔ ارگانیسم‌ها بر روی سطوح مختلف خصوصاً سطوح پلیمریک بوده که آزادشدن این میکرو ارگانیسم‌ها به درون خون، می‌تواند سبب یک عفونت منتشره گردد (۳). این در حالی است که درمان عفونت‌های منتشرهٔ حاصل از این میکرو ارگانیسم‌ها به واسطهٔ وجود بیوفیلم با مشکلاتی همراه است که دفاع میزبان و هم‌چنین درمان دارویی را با اختلال روبه‌رو می-نمایند (۴)، در واقع توانایی تشکیل بیوفیلم به ارگانیسم توان رقابت با فلور نرمال موجود در حفرات بدن را می‌دهد و به عنوان یک مخزن مطمئن در رهاسازی سلول‌های عفونت‌زا عمل می‌کند (۵، ۶).

مطالعات متعدد بیانگر وقوع عفونت قارچی کاندیدیازیس به وسیلهٔ کاندیدا دابلینسیس از عوامل عفونت-های بیمارستانی است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که وقوع کاندیدیازیس با ایجاد بیوفیلم مرتبط بوده و سلول‌ها در هنگام ایجاد بیوفیلم نسبت به سلول‌هایی که در شرایط طبیعی آزمایشگاه زندگی آزاد دارند، خصوصیات کاملاً متفاوتی را نشان می‌دهند (۷).

رشد بیوفیلم‌های کاندیدا روی مواد کاتتری به‌صورت لایهٔ مخمری فشرده است که سبب افزایش مقاومت به عوامل ضدقارچی مانند: فلوکونازول، نیستاتین، آمفوتریسین B و کلروکسیدین می‌شود. لذا عودهای مکرر کاندیدیازیس پس از استفاده از این داروها در افراد استفاده کننده از کاتترها مشاهده شده است (۸). لذا با توجه به هزینه‌بر بودن و وقت‌گیر بودن مسألهٔ درمان بیماری‌های عفونی و سایر مشکلات مرتبط با درمان و با توجه به پدیدهٔ جهش‌های ژنتیکی و افزایش مقاومت‌های دارویی نیاز به معرفی جایگزین‌های دارای خاصیت ضد میکروبی چه در سطح کنترل و چه در سطح پیش‌گیری و درمان ضروری می‌باشد.

از جمله نانو کامپوزیت‌هایی که در دههٔ اخیر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، نانوکامپوزیت‌های تقویت‌کنندهٔ اکسید روی است. علت استفاده از اکسید روی بزرگ بودن گاف انرژی، پایداری حرارتی شیمیایی، انرژی بستگی اکسایش بالا (۶۰mev) و غیر سمی بودن آن است. استفاده از اکسید روی قدمت زیادی داشته به طوری که رومی‌ها آن را «کادمیا» می‌نامیدند و از آن برای تولید آلیاژ برنج استفاده می‌کردند. آنها اکسید روی را پس از احیاء و سپس اکسید کردن، در ساخت پمادها استفاده می‌کردند. از دیر باز یون-های فلزی مانند نقره و مس کارکرد قابل قبول بهداشتی در

درمان بیماریها به طور سنتی داشته‌اند (۹).

اکسید روی، دوام و مقاومت در برابر کپک را بهبود می‌بخشد و در صنایع داروسازی و آرایشی، از ZnO در پودرها و پمادها استفاده می‌شود، زیرا خواص ضدباکتریایی آن بررسی شده است (۱۰-۱۲).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی خواص ضد قارچی نانوذرهٔ اکسید روی بر بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس که توانایی ایجاد لایهٔ میکروبی مقاوم به دارو (بیوفیلم) در سطوح مختلف به‌ویژه در تجهیزات پزشکی و پروتزها را دارد، می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعهٔ تجربی در سال ۱۳۸۹ به منظور تعیین خاصیت مهارکنندگی بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس نسبت به نانوذرهٔ ZnO، مهارکننده (SDS تهیه شده از شرکت sigma) و داروی فلوکونازول (تهیه شده از شرکت sigma) جهت اثبات خاصیت مهارکنندگی نانوذرهٔ ZnO بر سطح میکروپلیت ۹۶ خانه‌ایی با روش میکروبراث دایلوشن و با استفاده از نمک تترازولیوم MTT انجام شد.

کشت نمونهٔ قارچی موردآزمون:

سویهٔ استاندارد کاندیدا دابلینسیس DSY1024 مورد استفاده در این مطالعه از دانشگاه تهران تهیه شد. بر روی محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ^{C}۲۸ انکوبه گردید؛ پس از طی زمان انکوباسیون، از نمونهٔ قارچی جهت تهیهٔ سوسپانسیون مخمری استفاده شد.

تهیهٔ سوسپانسیون سلول مخمری کاندیدا:

برای تهیهٔ سوسپانسیون، ابتدا سلول‌های مخمری کاندیدا از سطح محیط کشت سابورودکستروز آگار که به مدت ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد (PH= ۷/۲) انکوبه گردیده بود به کمک لوپ استریل جمع‌آوری گردید. سپس در یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار رقیق گردید و توسط لام نئوبار شمارش گردید و از آن سوسپانسیون با تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد.

آماده‌سازی نانوذرهٔ ZnO :

پنج گرم استات روی (شرکتMerck کشور آلمان) با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه در ارلن ریخته شد و در حرارت به نحوی مخلوط گردید تا به یک پنجم حجم اولیه رسید، سپس درفور با دمای ^{C}۵ ± ۱۰۰ قرار داده شد تا به تدریج خشک شد. پس از آن در دمای ۲۰ ± ۳۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا کریستال‌ها کامل شدند. برای تأیید پراکنش مناسب ZnO از آزمون XRD استفاده گردید.

بررسی حساسیت نانوذرهٔ اکسید روی، مهارکنندهٔ SDS و فلوکونازول بر روی قارچ با انجام روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع توسط تست استاندارد میکرودایلوشن صورت پذیرفت. جهت انجام تست پیشنهاد شده، رقت‌های مختلف از ZnO ، SDS و فلوکونازول تهیه گردید.

تهیه رقت نانوذرهٔ ZnO:

جهت انجام تست ابتدا رقت‌های متوالی ۲۹۶- ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول کلوئیدی ZnO در آب مقطر تهیه و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری استریل گردید.

تهیهٔ رقت عامل دترژنت سدیم دودسیل سولفات (SDS):

جهت انجام تست ابتدا رقت‌های متوالی۰/۵۶- ۰/۰۰۱ گرم از پودر دترژنت SDS در یک میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد.

تهیهٔ رقت فلوکونازول:

ابتدا ۰/۰۰۱۲۸ گرم از پودر فلوکونازول در یک میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید حل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا استوک دارویی استریل گردد، سپس با استفاده از آب مقطر رقتهای ۱۲۸-۰۶۲/ میکروگرم در

میلی‌لیتر از فلوکونازول تهیه و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد.

تعیین حساسیت کاندیدادابلینسیس نسبت به نانوذرهٔ ZnO، مهارکنندهٔ SDS و فلوکونازول و تعیین تعداد کلنی‌های ایجاد شده (Colony Forming Unit) (CFU):

جهت تعیین حساسیت کاندیدادابلینسیس نسبت به نانوذرهٔ ZnO ابتدا رقت‌های ۲۹۶-۰/۰۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول کلوئیدی نانوذرهٔ ZnO، رقت‌های ۰/۵۶- ۰/۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول SDS و برای فلوکونازول نیز رقت‌های ۱۲۸-۰/۰۶۲ میکروگرم در میلی-لیتر از محلول فلوکونازول تهیه و جهت انجام تلقیح نگهداری شد، سپس مقدار ۱×۱۰^{۶} مخمر کاندیدا دابلینسیس را شمارش و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری و ۱۰میکرولیتر از محلول کلوئیدی نانوذرهٔ ZnO، مهارکنندهٔ SDS و داروی فلوکونازول به همراه ۲۰۰ میکرولیتر محیط سابورودکستروزبراث به صورت جداگانه به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد که جهت جلوگیری از خطای کاری این آزمایش سه بار تکرار گردید.

پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۴۸ ساعت در انکوباسیون قرار گرفته و پس از مدت انکوباسیون از هر چاهک مورد آزمون مقدار ۱۰ میکرولیتر برداشته بر روی محیط جامد SC (سابروی حاوی کلرامفنیکل) تلقیح گردید. محیط سابوروی اخیر به مدت ۴۸ ساعت در انکوباسیون قرار داده شد و پس از طی ۴۸ ساعت تعداد کلنی‌های حاصل شمارش و CFU در مقایسه با گروه کنترل منفی انجام گردید. میزان حداقل غلظت‌کشندگی و مهارکنندگی آنها محاسبه شد (۱٤).

تشکیل بیوفیلم در In vitro

برای ایجاد بیوفیلم ابتدا در چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI -۱٦٤۰ (شرکت Gibco، کشور آلمان) ریخته شد. سپس به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر سرم جنین گوساله ۱۰ درصد (FBS) (شرکت Sigma، کشور آمریکا) افزوده گردید و ۲٤ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی ۱×۱۰^{٦} سلول کاندیدا دابلینسیس در میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای ریخته شد و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردید.

تهیهٔ محلول کاری نمک تترازولیوم MTT

مقدار ۰/۰۰۵ گرم از نمک تترازولیوم MTT (شرکت Merck، کشور آلمان) توزین گردید و در ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS-1x مخلوط شد. محلول فوق با فیلتر ۰/۲۲ میکرولیتر فیلتر شد و در نهایت در فریزر ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره گردید.

سنجش میزان بیوفیلم با استفاده از نمک تترازولیوم MTT

هر یک از چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS سه بار شست‌وشو داده شد (بدین ترتیب که ۲۰۰میکرولیتر بافر PBS داخل چاهک‌ها ریخته شد و با سمپلر محلول روی تخلیه شد. مجدداً این رویه تا سه‌بار تکرار شد) تا اثر مواد SDS، نانوذرهٔ اکسید روی و داروی فلوکونازول بر روی آنها بررسی گردد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از هر یک از عوامل نانوذره، بیوساید SDS و داروی فلوکونازول به صورت مجزا در هر چاهک ریخته شد. پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد محلول فوقانی چاهک‌ها خارج شد و مقدار بیوفیلم مورد مطالعه با روش MTT اندازه‌گیری شد. برای سنجش با MTT، میزان ۲۰ میکرولیتر از نمک تترازولیوم آماده شده به هر چاهک افزوده شد و ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید به هر چاهک افزوده شد و مجدداً ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و در انتها با الایزاریدر جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به نحو

مقتضی از رگرسیون پروبیت و روش آماری t.test (نسخه ۱۸ نرم‌افزار SPSS در سطح معناداری ۰/۰۵ استفاده گردید.

یافته‌ها

با توجه به انجام روش میکروبراث دایلوشن جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و مقایسهٔ دو مهارکنندهٔ نانوذرهٔ اکسید روی و SDS در مقایسه با گروه کنترل مثبت (داروی فلوکونازول) نتایج ذیل حاصل گردید:

محدودهٔ MIC نانوذرهٔ اکسیدروی از ۲۹۶ تا ۰/۰۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، SDS ۰/۵۶تا ۰/۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و محدودهٔ داروی فلوکونازول از ۱۲۸تا ۰/۰۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید (جدول ۱). ۵۰ درصد از رشد قارچ کاندیدا نسبت به مهارکنندهٔ SDS در رقت ۰/۰۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۹۰ درصد در غلظت ۰/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۹۹ درصد در غلظت ۰/۰۳۵ در مقایسه با گروه شاهد در سطح معناداری (P<۰/۰۵) بود (جدول۱). نتایج به دست آمده برای نانوذرهٔ ZnO در غلظت ۲/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰ درصد مهارکنندگی قارچ کاندیدا دابلینسیس، در غلظت ۹/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۹۰ درصد و ۹۹ درصد مهارکنندگی کاندیدا دابلینسیس در غلظت ۱۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد از نظر آماری معنادار گزارش گردید (جدول ۱). غلظت‌های مختلف داروی فلوکونازول بر مخمر کاندیدا دابلینسیس نشان داد که در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰ درصد، در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد ۹۰درصد و در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد ۹۹ درصد قارچ مهار گردید که در مقایسه با گروه شاهد در سطح معناداری (P<۰/۰۵) بود (جدول ۱). بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس در غلظتی بیش از دو برابر غلظت MIC90 برای عوامل ZnO، SDS در مقابل گروه کنترل مثبت (داروی فلوکونازول) مهار گردید (جدول ۲).

غلظت‌های مختلف سه عامل SDS، نانوذرهٔ ZnO و داروی فلوکونازول بر رشد سویهٔ مقاوم به فلوکونازول کاندیدا دابلینسیس نشان داد که عوامل مزبور از طریق وابسته به غلظت قادر به مهار رشد کاندیدا می‌باشند (جدول۱).

نتایج به دست آمده از محدودهٔ MIC نانوذرهٔ ZnO ، SDS و داروی فلوکونازول به ترتیب: ۲۹۶- ۰/۰۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۰/۵۶- ۰/۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۲۸- ۰/۰۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید که در مقایسه با گروه شاهد از نظر آماری معنادار گزارش شد (P<۰/۰۵) (جدول۱).

نانوذرهٔ اکسید روی ۲/۳۱، ۹/۲۵ و ۱۸/۵ میکروگرم MFC و MIC90، MIC50 در این مطالعه میزان مشاهده گردید. بر میلی‌لیتر ZnO همچنین مطالعهٔ حاضر نشان داد که در غلظت‌های ابتدایی چون ۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنادار نداشته و در MTT کاهش حجم بیوفیلم با استفاده از نمک تترازولیوم (P<۰/۰۵). غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنادار بود. در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر هم اثر مهارکنندگی نانوذرهٔ اکسیدروی بر بیوفیلم کاندیدا در سطح معناداری (P<۰/۰۵) بود. در غلظت ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از مهارکنندهٔ SDS کاهش حجم بیوفیلم در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنادار نداشت(P<۰/۰۰۶). مهار بیوفیلم توسط مهارکنندهٔ SDS در غلظت ۰/۰۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل در سطح معناداری (P<۰/۰۵) بود که با افزایش غلظت مهارکنندهٔ SDS درصد مهارکنندگی بیوفیلم کاندیدا به طور معناداری در غلظت ۰/۰۶۴ (P<۰/۰۰۱) کاهش یافت. فلوکونازول نیز در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری در سطح(P<۰/۰۵) نسبت به غلظت‌های پایین‌تر آن داشت و در غلت‌های بالاتر از غلظت ۱۶میکروگرم بر

میلی‌لیتر مانند غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش حجم بیوفیلم در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنادار P=۰/۰۴ بود. غلظت‌های مهارکنندگی عوامل SDS، نانوذرهٔ اکسید روی و فلوکونازول بر بیوفیلم سویهٔ کاندیدا دابلینسیس در سطح معناداری (P<۰/۰۵) می‌باشد (جدول ۲) که این غلظت‌ها در حقیقت معادل بیش از دو برابر غلظت MIC بوده و نشان‌دهندهٔ تأیید کار آزمایشگاهی ما با محاسبات آماری است.

جدول 1: مقایسهٔ MFC و MIC_{90} نانوذره ZnO (محلول کلوییدی) SDS ، مهارکننده وفلوکونازول برای کاندیدا دابلینسیس

مهارکننده	محدودهٔ غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MIC میزان (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		MFC***میزان (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
		MIC_{50}*	MIC_{90}**	
SDS	0.001-0.56	0/009	0/020	0/035
ZnO نانوذره	0.058-296	2/31	9/25	18/5
فلوکونازول	0.062-128	2	8	16

*حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۵۰ درصد از قارچ نسبت به گروه کنترل منفی

** حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۹۰ درصد از قارچ نسبت به گروه کنترل منفی

***حداقل غلظت کشندگی قارچ نسبت به گروه کنترل منفی که در آن رشدی مشاهده نشد.

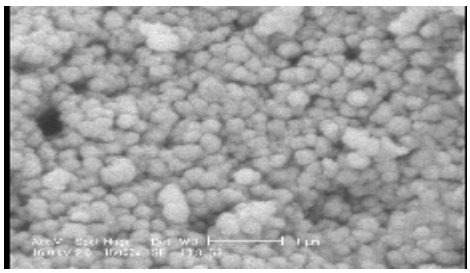
جدول 2: مقادیر غلظت (Mean±SD) و مقایسهٔ اثر مهارکنندگی نانوذرهٔ ZnO ، مهارکنندهٔ SDS، و فلوکونازول بر بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس

	کنترل منفی	ZnO	SDS	فلوکونازول
	Mean ± SD	(0.58-269) Mean ± SD	(0.001-0.56) Mean ± SD	(0.062-128) Mean ± SD
a	(0) 0.58±0.10	(0.058) 0.57 ±0.10	(0.001) 0.27±0.05	(0.062) 0.23±0.36
b	(0) 0.57±0.11	(2.31) 0.56±0.12	(0.002) 0.25±0.03	(0.25) 0.2±0.01
c	(0) 0.56±0.11	(4.62) 0.52±0.03	(0.004) 0.21±0.02	(0.5) 0.19±0.03
d	(0) 0.56±0.09	(9.25) 0.46±0.01	(0.00۹) 0.20±0.02	(2) 0.18±0.1
e	() 0.56±0.05	(16. 5) 0.44±0.01	(0.017) 0.18±0.01	(4) 0.18±0.02
f	(0) 0.55±0.12	(18.5) 0.35±0.02	(0.025) 0. 12±0.10	(8) 0.16±0.02
g	(0) 0.55±0.07	(25) 0.03±0.01	(0.03۵) 0.12±0.02	(16) 0.07±0.02
h	(0) 0.55±0.04	(64) 0.04±0.007	(0.064) 0.06±0.02	(32) 0.05±0.01
i	(0) 0.55±0.01	(128) 0.02±0.006	(0.۱28) 0.04±0.18	(64) 0.04±0.15
j	(0) 0.55±0.00	(296) 0.01±0.004	(0.56) 0.04±0.01	(128) 0.04±0.01

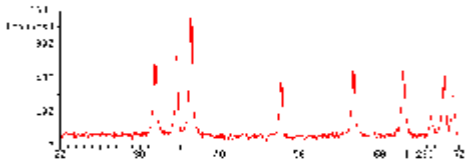
18.5 : af,ag,ah,ai,aj,bf,bg,bh,bi,bj,cf,cg,ch,ci,cj,df,dg,dh,di,dj,ef,eg,eh,ei,ej,p<0.05.; ab, ac, =ZnO ad,ae,bc,cd,bd,de,be,fg,fh,fi,fj,gh,hi,ij,insignificant.

SDS=0.01: ae,af,ag,ah,ai,aj,be,bf,bg,bh,bi,bj,ce,cf,ch,ci,cj,de,df,dg,dh,di,dj,p<0.05. insignificant. ab, ac, ad,bc,bd,cd,ef,eg,eh,ei,ej,gh,hi,ij,

فلوکونازول.P<0.05 1: ag,ah,ai,aj, bg bh, bi, bj, cg,ch,ci,cj, dg,dh,di,dj, eg,eh,ei,ej,fg,fh,fi,fj = ab, ac,ad,ae,af, bc,bd,be,bf, cd,cg,ce,cf, ,de,df, ef, ,gh,gi,gj,hi,hj,ij,de,df insignificant.



شکل1: میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ روبشی از نانو ذرهٔ ZnO



شکل 2: شمای XRD از نانوذره ZnO

بحث

در سال‌های اخیر افزایش عفونت‌های قارچی ناشی از قارچ‌های بیماری‌زا و فرصت‌طلب به‌ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی نظیر دیابتی‌ها و افراد مبتلا به ایدز و افرادی که به‌وسیلهٔ آنتی‌بیوتیک‌های با طیف گسترده به‌مدت طولانی درمان شده‌اند، مشاهده شده است (۱۵، ۱۶). کاندیدا دابلینسیس قادر است با توجه به ساختار دیوارهٔ سلولی خود به سطوح مختلف آلی و غیرآلی اتصال یافته و در مدت زمان کوتاهی تجمع یابد. امروزه استفاده از کاتترهای وریدی یا ادراری، دریچه‌های پروستتیک، مفاصل مصنوعی، پروتزها و سایر ایمپلنت‌های پزشکی متداول است. میکرو ارگانیسم‌های مختلف از جمله کاندیدا دابلینسیس که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند، می‌توانند روی این مواد چسبیده و با کلونیزاسیون و ایجاد عفونت، مشکلات خاصی را ایجاد کنند (۱۷و۱۸).

در تحقیق حاضر، بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای تشکیل و در حضور غلظت‌های متفاوتی از محلول کلوییدی نانوذرهٔ ZnO که خودمان سنتز کرده بودیم در مقایسه با مهارکنندهٔ SDS با نمک تترازولیوم MTT بررسی گردید. به طوری‌که حداقل غلظت مهارکنندگی بیوفیلم به طور معناداری کمتر از گروه کنترل برای دو مهارکنندهٔ ZnO، SDS و داروی فلوکونازول به ترتیب: ۲۵، ۰/۰۶۴، ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

دترژنت‌ها عموماً قابل حل در آب بوده و با داشتن بخش‌های هیدرفوب و هیدروفیل امکان لیز غشاهای لیپیدی را دارند. سدیم دودسیل سولفات قابلیت نفوذپذیری زیادی بر دیوارهٔ سلولی و غشای سیتوپلاسمی از طریق اتصال به لیپیدها و پروتئین‌ها و دناتوره کردن از طریق تخریب ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها را دارد. واکنش SDS با پروتئین‌ها فعالیت آنزیمهای مختلف مانند ATpase، آسیل ترانسفراز کیتین به کلسترول را مهار می‌کند. اما غلظت زیاد SDS اثر سمیت روی سلول داشته و موجب تخریب دیواره و غشاهای سلول و یا تخریب پروتئین‌های سلول میزبان می‌شود. همچنین SDS می‌تواند منجر به تخریب پروتئین-های میکرو ارگانیسم و بافت میزبان گردد (۱۹). مطالعهٔ حاضر نشان داد که در غلظت‌های ابتدایی چون ۰/۵۸ از نانوذرهٔ ZnO ، کاهش حجم بیوفیلم با استفاده از نمک تترازولیوم MTT در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنادار

نداشته و در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنادار بود (P<۰/۰۵).

نت (Nett) و همکاران در سال ۲۰۰۸ با تحقیقی، اثر ۳ بیوساید اتانول، H_2O_2 و SDS را بر بیوفیلم گونه‌های کاندیدا مطالعه نمودند و دریافتند که ۳۵-۲۵درصد ETOH، ۱۵-۲۵۰Mmol H2o2 و ۰/۱۵-۰/۰۵ SDS سبب کاهش رشد بیوفیلم‌های کاندیدا شدند (۲۰).

در تحقیق حاضر نیز حداقل غلظت مهارکنندگی SDS معادل ۰/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید و تقریباً در غلظتی معادل بیش از دو برابر غلظت MIC بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس را مهار کرد که با مطالعهٔ نت و همکاران مطابقت داشت و بیوساید SDS سبب کاهش رشد بیوفیلم‌های کاندیدا گردید.

امروزه نانوذرات به دلیل کاربردهای متنوع تنها در زمینه-های مختلف صنعتی و بهداشتی، از جمله عواملی هستند که ضروری است تا خواص ضدقارچی آنها مورد تعمق و تحقیق بیشتر قرار گیرد؛ چرا که از دیرباز یون‌های فلزی مانند نقره و مس کارکرد قابل توجهی در بهداشت و در درمان بیماری‌ها داشته‌اند (۲۱). نانوذرهٔ ZnO با اتصال به غشای میکرو ارگانیزم‌ها فاز تأخیری چرخهٔ رشد را طولانی کرده و مدت زمان جوانه‌زنی ارگانیسم‌ها را افزایش می‌دهد (۲۲).

در سال ۱۹۵۰ دانشمندان شروع به بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرهٔ ZnO کردند. اخیراً بیشتر مطالعات بنیادی روی فعالیت ضدباکتریایی اکسیدهای فلزی است. ذرات ZnO کوچک دارای فعالیت ضد قارچی هستند. فعالیت ضد قارچی ZnO بستگی به سطح و غلظت مواد دارد، در حالی‌که ساختار کریستالی و شکل ذرات اثر کمی در خاصیت ضدقارچی دارد. غلظت بالا فعالیت ضد قارچی را افزایش می‌دهد (۲۳).

آیدا و یاماموتو (Iida &Yamamoto) در سال ۲۰۰۳ خصوصیات ضد قارچی ترکیبات کربنی اکسید روی را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که با افزایش دما فعالیت ضدقارچی ترکیبات کروی کربنی با ZnO افزایش نیافته، بلکه با افزایش غلظت پودر، فعالیت ضدقارچی افزایش پیدا کرد (۲۴). در این تحقیق با توجه به ماهیت متفاوت سنتز نانوذره به صورت محلول کلوییدی نیز با افزایش غلظت محلول کلوییدی ZnO از ۰/۰۵۸ تا ۲۹۶ میکروگرم در میلی‌لیتر فعالیت ضدکاندیدیایی نانوذره افزایش یافته بود که این یافته با نتایج یاماموتو مشابه می‌باشد.

در خصوص خواص ضد باکتریایی ZnO با استفاده از روش مرطوب (سل-ژل) مطالعاتی توسط ژانگ (Zhang) و همکاران (۲۰۰۸) انجام پذیرفت (۲۵). در مطالعهٔ حاضر نیز مشابه مطالعهٔ ژانگ، نانوذرهٔ ZnO با استفاده از روش مرطوب سل- ژل تهیه شد با این تفاوت که در این تحقیق خواص ضدقارچی نانوذرهٔ اکسیدروی بررسی گردید و سبب مهار بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس شد.

رامیج (Ramage) و همکاران در سال ۲۰۰۱ روش میکروپلیت را، که روشی ساده، مفید و با تکرارپذیری بالا برای آنالیز نیمه کمی بیان تشکیل بیوفیلم تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول بر میلی‌لیتر در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای برای تعیین حساسیت داروهای ضدقارچی از روش رنگ‌سنجی (Hawser،Tellier) و همکاران،۲۰۰۳) نمک تترازولیوم MTT استفاده نمودند و برای تعیین حساسیت بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس نسبت به عوامل ضد قارچی مانند آمفوتریسین B و فلوکونازول به کار گرفتند. در این روش کاهش شدت رنگ تناسب معناداری با غلظت اثر بیوسایدها داشت (P<۰/۰۵) (۲۶). در این تحقیق نیز به منظور تشکیل بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس و تعیین حساسیت این سویه نسبت به نانوذرهٔ اکسیدروی و SDS از روش میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد (سنویریت (Senevirate) و همکاران، ۲۰۰۹) با این تفاوت که به جای استفاده از آمفوتریسین B از بیوسایدهای SDS و نانوذرهٔ ZnO استفاده شد که نتایج افزایش غلظت SDS و نانوذرهٔ

اکسیدروی متناسب با کاهش حجم بیوفیلم و افزایش غلظت بیوسایدها مشابه با نتایج پژوهش تلایر (Tellier) و هاوسر (Hawser)، معنادار (P<۰/۰۵) بود (جدول ۳-۱،۳-۲ و۳-۳).

با افزایش غلظت محلول کلوییدی نانوذره از ۰/۰۵۸ تا ۲۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضدکاندیدایی افزایش یافت که نشان می‌دهد با افزایش غلظت نانوذره، خاصیت ضدکاندیدیایی افزایش می‌یابد. این نتایج با مشاهدات داگلاس و همکاران مطابقت داشت.

در این تحقیق برای رسیدن به تجمعی از کاندیدا (بیوفیلم) از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای و روش میکروتیتر استفاده گردید. پس از تشکیل بیوفیلم، ZnO در غلظتی معادل دو برابر MIC توانست بیوفیلم سویهٔ حساس را مهار کند، این قدرت مهاری توسط، نمک تترازولیوم MTT ارزیابی گردید. جهت ارزیابی میزان بیوفیلم‌ها روشهای دیگری نیز مانند استفاده از تکنیک FISH وجود دارد. اما در این مطالعه از روش‌های قابل دسترس حساس و قابل تکرارپذیری در سطح آزمایشگاه استفاده شد که سایر محققان مانند سنویریت و همکاران در سال ۲۰۰۹، چاندرا و همکاران در سال ۲۰۰۳ استفاده کردند (۲۷). نتایج این تحقیق به منظور کاهش حجم بیوفیلم نسبت به نانوذرهٔ اکسیدروی متناسب با کاهش شدت رنگ نمک تترازولیوم MTT به کار رفت که این یافته با نتایج سنویریت و همکاران به منظور کاهش حجم بیوفیلم با استفاده از بیوسایدها انطباق داشت و خاصیت ضدقارچی نانوذرهٔ اکسیدروی را به منظور استفاده از بیوساید بر سطوح پزشکی تأیید نمود.

تست MTT یک روش رنگ‌سنجی نیمه کمی است که حیات سلول‌ها را اندازه‌گیری می‌کند. این آزمون بر اساس شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیلهٔ آنزیم میتوکندریایی سوکسینات‌دهیدروژناز که فقط در سلول‌های زندهٔ فعال موجود بوده انجام می‌شود که نتیجهٔ آن مادهٔ ارغوانی رنگ نامحلولی به نام فرومازان است که با استفاده از حلالی نظیر دی‌متیل‌سولفوکساید، تغییر رنگ و تغییر جذب نوری آن اندازه‌گیری می‌گردد (۲۸و۲۹).

در تحقیق حاضر، سویه کاندیدا دابلینسیس در حضور غلظتهای متفاوتی از محلول کلوییدی نانوذرهٔ ZnO که خودمان سنتز کرده بودیم در مقایسه با مهارکنندهٔ SDS بررسی گردید. به طوری که تعداد کلنی‌های شمارش شده در محیط آگار به طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود که MIC_{90} نانوذرهٔ ZnO و مهارکنندهٔ SDS در این بررسی به ترتیب ۲۵ و ۰/۰۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. میزان مهار بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس در مقابل نانوذرهٔ ZnO و مهارکنندهٔ SDS تقریباً بیش از دو برابر MIC_{90} برآورد شد.

باتوجه به نتایج این تحقیق و مطالعات سایر محققان می‌توان به این نانوذره به عنوان یک مادهٔ از بین برندهٔ کاندیدا دابلینسیس به عنوان یکی از قارچ‌های پاتوژن در سطوح P.v.C و تجهیزات پزشکی در بیماران ضعف سیستم ایمنی به ویژه بیماران ایدزی دانست. لذا شناسایی عوامل و مواد دارای خاصیت ضد میکروبی امروزه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، نانوذرهٔ ZnO تأثیر ضدعفونی کنندگی بسیار قابل توجهی بر بیوفیلم کاندیدا دابلینسیس در مقایسه با سایر بیوسایدها نشان داد. استفاده گسترده از داروهای ضد قارچی به ویژه ترکیبات ازول در درمان کاندیدیازیس حاد منجر به مقاومت در گونه‌های کاندیدا شده است؛ از این رو استفاده از تست‌های مناسب ضد قارچی قبل از انتخاب داروی مناسب برای هر یک از عفونت‌های ذکر شده ضروری است که این امر منجر

به کاهش مقاومت‌های ثانویه و انتخاب پروتکل‌های درمانی مناسب می‌گردد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق اثر دو مهارکنندهٔ SDS و ZnO از طریق وابسته به غلظت، قادر به مهار نسبی یا کامل رشد بیوفیلم دابلینسیس بوده و میزان مهار رشد با تغییر غلظت ارتباط مستقیم دارد که می‌تواند به عنوان یک بیوساید مناسب در پیش‌گیری از بروز عفونت‌های کاندیدا دابلینسیس به ویژه بر روی سطوح پزشکی مورد استفادهٔ بیماران تضعیف‌کنندهٔ سیستم ایمنی مانند ایدزی‌ها به کار رود.

قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت عنوان پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد رشتهٔ قارچ‌شناسی پزشکی انجام شده است. در انتها از سرکار خانم رازقی و آقای کیایی کارشناسان محترم گروه قارچ‌شناسی و علوم آزمایشگاهی که در انجام مطالعه دخالت داشته‌اند، سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع

1-Zaini F, Mehbod ASA, Emami M. Comprehensive Medical Mycology. Tehran: University of Tehran Press; 2009. P. 353-57.
2- Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices. Clin Microbial Rev 2004;17(2):255-67.
3- D'Antonio D, Romano F, Pontieri E, Fioritoni G, Caracciolo C, Bianchini S, et al. Catheter–related candidemia caused by candida lipolytica in a patient receiving allogeneic bone marrow transplantation. J clin Microbial 2002;40(4):1381-6.
4- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature 2002;417(6888):552-5.
5-Wigglesworth–cooksey B, Berglud D, Cooksey KE. Cell-cell and cell-surface interactions in an illuminated biofilm: Implications for marine sediment stabilization. Geochem Trans 2001;2(1):75-82.
6-Douglas LJ.Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbial 2003;11(1):30-6.
7- Eick S, Seltmann T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study. J clin periodontal 2004;31(5):376-83.
8- Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm formation by and antifungal susceptibility in Candida isolates from urine. Apple Environ Microbiol 2007; 73(6):1697-703.
9- Khan, Aurangzeb. Synthesis, characterization and luminescence properties zinc oxide nanostructures [dissertation]. Ohaio:the college of Arts and siences; 2006.
10-Messager S, Goddard PA, Dettmar PW, Maillard JY. Comparison of two in vivo and two ex vivo tests to assess the antibacterial activity of several antiseptics. J Hosp Infect 2004;58(2):115–12.
11-Dettenkofer M, Wenzler S, Amthor S, Antes G, Motschzall E, Daschner FD. Does disinfection of environmental surfaces influence nosocomial infection rates? A systematic review. Am J Infect Control 2004;32(2):84-9.
12-Wang LI. Photoluminescence Study of Asgrown and Thermally Annealed Bulk ZnO Crystals [dissertation]. Morgantown**:** West Virginia Universi; 2004.
13-Nebauer E, Merkel U, Würfl J. Structure and stability studies on W, WSi, WSiN/GaAs systems by XRD. Semicond Sci Technol 1997;12(9):1072–1078.
14-Atmaca S, GÜL K, ÇIÇEK R. The effect of zinc on Microbial growth medical .J of Medical Sciences 1998;28:595-597.
15- LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(11):3839–46.
16- Akiba N, Hayakava I, Keh ES, Watanabe A. Antifungal effect of a tissue conditionar coatingagent with TiO2 photocatalyst. J Med Dent Sci 2005; 52: 223_7.
17-Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007;20(1):133–63.
18- Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices. Clinical Microbiology Reviews 2004; 14: 255–67.

19-Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol 2006;9(6):588–94.
20-Lia JH, Hong RY, Lic MY, lib HZ , Zhenged Y, Dine J. Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of poly are than coating. Progress in organic coating 2009;64(4):504-9.
21-Nett JE, Guite KM, Ringeisen A, Holoyda KA, Andes DR. Reduced Biocide Susceptibility in Candida albicans Biofilms. Antimicrob Agents chemother Sept 2008;52(9):3411–3.
22- Panácek A, Kolár M, Vecerová R, Prucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp. Biomaterials 2009;30(31): 6333–40.
23-Saiwa A, Hang I and Ding J.Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coating.J Elsevier.2009; 64:504-509.
24-Kumamoto CA. Candida biofilms. Curr Opin Microbiol 2002;5(6):608–11.
25-Yamamoto O, Iida Y. Antifungal characteristics of spherical carbon materials with Zinc Oxide. J Ceram Soc JPN 2003;111(1296):614-6.
26-Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent. Prog Nat Sci 2008;18(8):939–44.
27-Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(9):2475–9.
28-Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of Candida albicans and Candida glabrata biofilms. Arch Oral Biol 2009;5 4(11):1052 -60.
29-Plumb JA. cell sensivity assays: the MTT assay. Methods Mol Med 2004;88:165-9.
30-Gordon O, Vig Slenters TV, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection; thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(10):4208-18.

Colorimetric MTT Assessment of Antifungal Activity of ZnO Nanowires Against Candida Dubliensis Bioflm

Seyedeh Sadighe Hosseni[1*], Hamid Reza Joshaghani[2], Mehdi Eskandari[3]

1-MSc of Medical Mycology.
2-Assistant Professor of Biochemistry.
3-MSc of Nanomaterial Engineering.

1-Department of Medical Mycology, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2-Department of Biochemistry, Biochemistry and Metaolic Disorder Research Center, Gorgan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
3-School of Engineering, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Seyedeh Sadigheh Hosseini;
Department of Medical Mycology, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel:+98171-2232994
Email: hoseini_se@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: In recent years the incidence opportunistic fungual infections has in creased dramatically.One of the most common fungal pathogen *Candida dubliniensis*, colonization and biofilm formation on the surfaces of medical devices. The aim of this study was to evaluate the inhibitory activity of zinc oxide nanoparticles against *C. dubliniensis* biofilm formation by the MTT colorimetric method is measured.

Materials and Methods: In this study, ZnO nanoparicles using the sol-gel was prepared, size and type of particles, respectively, by scanning electron microscopy (SEM) and X-Ray-Diffraction were determined. The Minimum inhibitory concentration (MIC) of growth dilution method was done by microdilution test.
C.dubliensis biofilms (DSY 1024) after 48h incubation at 37ºC inhibited the information of nanoparticles ZnO,SDS and Fluconazole drug as a positive control on Candida biofilms was assessed by MTT tetrasolium salt reduction. The collected data using statistical t-test and SPSS software were analyzed.

Results: The results of this study showed that a minimum concentration of inhibitor nanoparticles, ZnO, SDS and fluconazole, respectively: 9/25, 0/02, 8 µg/ml. Inhibitory strength of biofilm adhesion in the presence of nanoparticles ZnO, SDS and fluconazole, equivalent to more than twice the concentration of the MIC was determined.

Conclusion: In this study, ZnO nanoparticles synthesized by a chemical method indicat that has anti-fungal properties. Therefore, a new way of working for the prevention of biofilm formation of Candida biofilms particularly associated with medical devices to be.

Keywords: Candida dubliensis, Biofilm, ZnO Nanowires, MTT.

►*Please cite this paper as:*
Colorimetric MTT Assessment of Antifungal Activity of ZnO Nanowires Against Candida Dubliensis Bioflm. *Amoozegari Z, Zare Mirak A, Noorbehbahani M. Jundishapur Sci Med J 2013;12(1):69-80*

Received: July 20, 2011 **Revised: May 14, 2012** **Accepted: July 15, 2012**