

## Evaluation of antimicrobial effect of copper-silver-chitosan nanocomposite in immuno-suppressed *Candida albicans*-infected rats

Ashrafi, M.<sup>1</sup>, Bayat, M.<sup>2\*</sup>, Mortazavi, P.<sup>3</sup>, Hashemi, J.<sup>4</sup>, Meimandipour, A.<sup>5</sup>

- 1- Ph.D. Student of Mycology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Specialized Sciences, Science & Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran.
- 2- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Specialized Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
- 3- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
- 4- Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 5- Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National institute of genetic Engineering and Biotechnology, Iran.

\*Corresponding author's email: dr\_mansour\_bayat@yahoo.com  
(Received: 2021/10/6 Accepted: 2022/2/20)

### Abstract

*Candida albicans* is a common yeast in opportunistic fungal diseases worldwide, which is frequently colonized on the surface of the skin and mucous membranes. The aim of this study was to investigate the effect of copper-silver-chitosan nanocomposite on the mentioned yeast. To synthesize the nanocomposite, first of all, chitosan was dissolved in water using ultrasonic device, the binding of chitosan and glutaraldehyde was determined by FT-IR technique and the size and morphology of the synthesized nanocomposite were determined by SEM microscopy. In the animal study section, 43 male Wistar rats weighing 200-250 gr, in 5 groups of 7 were examined. The immune system of mice was weakened by intra-peritoneal injection of 30 mg/kg cyclophosphamide and candidiasis was subsequently induced by oral inoculation of candida suspension. After treatment with copper-silver-chitosan nanocomposite and nystatin, it was found that the number of inflammatory cells in other groups was higher than the nystatin treated group. Also, the number of cells in copper-silver-chitosan nanocomposite treated group was much lower than in the other groups of mice with weakened immune system and untreated candidiasis. The findings of the present study showed that the therapeutic effect of the nanocomposite against candidiasis was relatively high and had a positive effect on reducing inflammation. Although the anti-yeast effect of copper nanoparticles and chitosan nanoparticles was not proven separately, but based on the current results, it was found that their combination has a slight synergistic effect and to some extent, slightly improved their antifungal properties.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** *Candida albicans*, Immunosuppressive, Inflammation, Nanocomposite.

## بررسی تاثیر ضد میکروبی نانوکامپوزیت مس-نقره- کایتوسان در موش‌های صحرائی با ایمنی سرکوب‌شده و مواجهه‌یافته با مخمر *کاندیدا آلبیکنس*

محسن اشرافی<sup>۱</sup>، منصور بیات<sup>۲\*</sup>، پژمان مرتضوی<sup>۳</sup>، سیدجمال هاشمی<sup>۴</sup>، امیر میمنندی پور<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری قارچ‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴- استاد گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۵- عضو هیات علمی گروه زیست‌فناوری دامی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهران، تهران، ایران.

\*نویسنده مسول مکاتبات: dr\_mansour\_bayat@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۷/۱۴ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۱۲/۱)

### چکیده

*کاندیدا آلبیکنس* مخمر شایع در بیماری‌های قارچی فرصت طلب در سراسر دنیا می‌باشد که به فراوانی روی سطح پوست و غشاهای مخاطی کلونیزه می‌شود. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر نانوکامپوزیت مس-نقره- کایتوسان روی مخمر مذکور بود. برای سنتز نانوکامپوزیت مورد نظر، ابتدا کایتوسان به کمک دستگاه التراسونیک در آب مقطر انحلال یافته، اتصال کایتوسان و گلو تار آلدئید با تکنیک FT-IR (fourier transform infrared spectrometer) تایید و اندازه و موفولوژی نانوکامپوزیت سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد. در قسمت مطالعه حیوانی، ۴۳ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در ۵ گروه ۷-تایی مورد بررسی قرار گرفت. سیستم ایمنی موش‌ها با استفاده از داروی سیکلوفسفامید با دوز ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با تزریق داخل صفاقی تضعیف شده و با تلقیح دهانی سوسپانسیون کاندیدیایی به کاندیدایازیس مبتلا گشتند. پس از درمان با نانوکامپوزیت مس-نقره- کایتوسان و نیستاتین، مشخص گردید که تعداد سلول‌های التهابی در سایر گروه‌های مورد بررسی در مقایسه با گروه درمان‌شده با نیستاتین، بیشتر بود. همچنین تعداد سلول‌های التهابی در گروه درمان‌شده با نانوکامپوزیت نقره-مس-کایتوسان بسیار کمتر از گروه موش‌های مبتلا به کاندیدایازیس و سیستم ایمنی ضعیف‌شده که تحت درمان نبودند، بود. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که اثر درمانی نانوکامپوزیت مس-نقره- کایتوسان علیه کاندیدایازیس، نسبتاً بالا بوده و تاثیر مثبتی در کاهش التهاب داشتند. گرچه اثر ضد مخمری نانوذرات مس و نانوذرات کایتوسان به طور مجزا اثبات نشد ولی بر اساس نتایج به دست آمده مشخص گردید که ترکیب آن‌ها اثر هم‌افزایی اندکی داشته و مقداری هرچند اندک، بر خاصیت ضدقارچی آن‌ها موثر است.

کلیدواژه‌ها: التهاب، سرکوب ایمنی، *کاندیدا آلبیکنس*، نانوکامپوزیت، موش صحرائی.

## مقدمه

به علت این‌که در قالب فلور طبیعی در سطوح مخاطی کلونیزه شده‌اند، سبب کاهش اهمیت آن می‌شود. علاوه بر آن، چون آنتی‌ژن‌های گونه‌های *Candida* اغلب به سرعت از گردش خون پاک می‌شوند، این امر هم، باعث کاهش حساسیت آزمایشات سرولوژیکی، در تشخیص *Candida albicans* می‌شود (Ellepolo and Morrison, 2005).

با توجه به این‌که در حال حاضر، مقاومت اکثر میکروارگانیسم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته است، بنابراین تلاش‌های زیادی برای سنتز ترکیبات ضد میکروبی موثر بر بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا که تهدیدی خطرناک برای سلامتی هستند، انجام شده است. در این راستا، علم نانوتکنولوژی هم که یک حوزه تحقیقاتی مهم در زمینه دستکاری و طراحی ذرات کوچک در محدوده ۱۰۰ نانومتر یا کمتر به نام ذرات نانو که دارای طیف وسیعی از خواص متفاوت مانند الکتریکی، نوری، مغناطیسی، کاتالیزوری و بیولوژیکی هستند و اهمیت آن‌ها با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی در برابر گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت و قارچ‌ها نشان داده شده، مورد توجه قرار گرفته است (Ren et al., 2009).

عفونت‌های قارچی ناشی از گونه‌های *Candida* و افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به داروهای آزولی در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی از اهمیت بالایی برخوردار است. سمیت داروهای مورد استفاده، ایجاد مقاومت در این قارچ‌ها و مشکلات ناشی از تداخل دارویی، ضرورت استفاده از داروهای با تاثیر بیشتر و سمیت کمتر را موجب می‌شود (Friedman and Schwartz, 2019). امروزه علاوه بر تلاش برای ساختن داروهای

با وجود این‌که *Candida albicans* ( *Candida albicans* ) شایع‌ترین عامل کاندیدیازیس مهاجم بوده و دوسوم کل گونه‌های کاندیدای جداشده از این بیماران را در سراسر جهان تشکیل می‌دهد، اما سایر گونه‌های کاندیدا، مانند *Candida krusei*، *Candida tropicalis* و *Candida parapsilosis* هم از عوامل پاتوژن کاندیدیازیس مهاجم می‌باشند (Sütçü et al., 2017). گزارش شده است که در حدود ۱۱-۶ درصد از عفونت‌های خونی مثبت، ناشی از گونه‌های کاندیدا است. همچنین علاوه بر عفونت‌های جلدی و مخاطی، این پاتوژن‌های فرصت‌طلب در افراد با اختلال سیستم ایمنی می‌توانند عفونت مهاجم مزمن یا حاد ایجاد کنند که می‌تواند محدود به یک ارگان بوده یا به صورت منتشره باشد (Shafiei et al., 2019). به این عفونت‌ها که در اکثر مواقع منجر به مرگ می‌شود، عفونت کاندیدیازیس مهاجم می‌گویند (Marins et al., 2018; Mehraban et al., 2019). در حال حاضر تشخیص اولیه بیماری فوق مشکل بوده و اغلب با مشاهده نشانه‌ها و عوارض بالینی که معمولاً غیراختصاصی است و نیز کشت که در اغلب موارد منفی بوده و یا در صورت مثبت بودن، خیلی دیر مثبت می‌شود، انجام می‌گیرد (Arancia et al., 2006). همچنین بررسی‌های ایمنولوژیکی جهت یافتن آنتی‌ژن‌های کاندیدا و یا آنتی‌بادی‌های ضد آن در جریان گردش خون، حساسیت و ویژگی‌های متغیری از خود نشان می‌دهند، به طوری که استفاده از آزمایشات سرولوژیک جهت یافتن آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه آنتی‌ژن گونه‌های کاندیدا

علوم دارویی قلهک-تهران، ایران با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.079 انجام شد.

- سنتز نانو کامپوزیت مس-نقره-کایتوسان: به منظور سنتز نانو کامپوزیت، ابتدا مقدار ۱ گرم کایتوسان (سیگما، ایران) به کمک دستگاه التراسونیک (مدل ۵۵۷۴۳-فریتز، آلمان) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و pH آن با استفاده از محلول اسید استیک ۱ درصد (مرک، آلمان)، در محدوده ۳ تنظیم گردید (متلر تولدو، سوئیس). محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در معرض امواج مافوق صوت دستگاه التراسونیک قرار گرفت و در ادامه روی همزن مغناطیسی (آیکا، آلمان) با دور ۵۰۰۰ در دقیقه قرار داده شد و در این حال، کلوئیدهای نانوذرات نقره سنتز شده و نانوذرات مس سنتز شده به آن افزوده شدند. عملیات همزدن به مدت ۱۵ دقیقه دیگر ادامه یافت. سپس محلول رقیق گلو تار آلدئید (مرک، آلمان) در حالی که محلول مذکور با دور ۷۰۰۰ در دقیقه توسط همزن مغناطیسی هم‌زده می‌شد، به صورت قطره قطره به آن افزوده شد. لازم به ذکر است که عملیات همزدن، به مدت ۲ ساعت در تاریکی با دور ۳۰۰۰ در دقیقه ادامه یافت (Karimiyan et al., 2015).

-تعیین مشخصات نانوکامپوزیت سنتز شده: برای تایید اتصال کایتوسان و گلو تار آلدئید و پیشرفت سنتز نانوکامپوزیت، از تکنیک FT-IR (شیماتسو مدل ۴۳۰۰، ژاپن)، و برای تعیین سایز و موفولوژی نانوکامپوزیت سنتز شده از روش میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (Philips XL30, Scanning Microscope, Philips, Netherlands) واقع در مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی واقع در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی،

شیمیایی موثر در درمان کاندیدیازیس، در تحقیقات بسیاری از نانوذرات فلزی نیز در درمان بیماری مذکور استفاده شده و نتایج درخور توجهی نیز حاصل شده است (Javadi et al., 2009; Ghavidel et al., 2016; Yousefi et al., 2019a; Yousefi et al., 2019b). از جمله این نانوذرات فلزی می‌توان به نانوذرات نقره، مس، اکسید روی و نانوذرات پلیمری، از جمله کایتوسان اشاره کرد. در این میان نانوذرات آلیاژی، نانوذرات نقره، ید، مس و ید نیز از نظر تاثیر بر روی میکروارگانیزم‌های مختلف هم تحت بررسی قرار گرفته‌اند. نانوذرات نسبت به سایر عوامل ضد قارچی سطح بیشتری را در برمی‌گیرند و علاوه بر آن نفوذ بهتری در بافت‌ها و سلول‌ها دارند و لذا در حال حاضر، در بین عوامل ضد میکروبی، به آن‌ها جدید توجه ویژه‌ای شده است (Karimiyan et al., 2015). در این بین مخصوصاً سمیت بالای مس برای باکتری‌هائی چون *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکولای* به عنوان یک باکتری کش موثر در تصفیه آب و بسته‌بندی مواد غذایی، اثبات شده است (Thanh and Green, 2010).

با توجه به موارد ذکر شده، هدف از انجام مطالعه حاضر، سنتز نانوکامپوزیت مس-نقره-کایتوسان و بررسی اثرات ضدقارچی آن بر روی کاندیدا آلبیکنس در موش صحرائی، به عنوان مدل آزمایشگاهی بود.

## مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر در سال ۱۳۹۷ در دانشکده علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد

- بررسی فعالیت ضد قارچی نانوذرات مورد مطالعه: به این منظور، سویه مورد استفاده از *کاندیدا آلبیکنس* در تحقیق حاضر، ابتدا در محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده‌شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (تا تولید کلونی‌های لازم) گرمخانه‌گذاری گردید. از این محلول محیط کشت سابورو دکستروز آگار (۱۰۰ میلی‌لیتر) به همراه سه سطح از غلظت‌های نانوذرات که قبلاً تهیه شده بود (غلظت‌های ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰) جهت کشت استفاده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری انجام شد. سپس از رقت ۰/۵ مک فارلند *کاندیدا آلبیکنس* تهیه‌شده با کمک آنس کشت داده شد. پس از ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، کمترین غلظت از نانوکامپوزیت که مخمر مذکور در آن قادر به رشد نبود، به عنوان حداقل غلظت مهارکننده از رشد (minimum inhibition concentration; MIC) این ماده برای *کاندیدا آلبیکنس* در نظر گرفته شد.

- حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده: در بررسی حاضر، تعداد ۴۳ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور تهران تهیه شده و جهت سازگاری با محیط جدید، به مدت یک هفته در بخش نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، در شرایط مطلوب دمایی (۲۵-۲۰ درجه سلسیوس) و رطوبت کافی (۶۰-۵۰ درصد)، در قفس‌های مخصوص نگهداری موش صحرایی قرار گرفتند. همچنین در طی مدت مذکور، آب و مواد غذایی کافی در اختیار حیوانات قرار داده‌شد. سپس موش‌های فوق، به شرح زیر، در ۵ گروه ۷ سری، به‌طور تصادفی تقسیم گردیدند

واحد علوم و تحقیقات، استفاده شد. لازم به ذکر است که طیف FT-IR نانوکامپوزیت مس-نقره-کایتوسان با استفاده از دستگاه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه در دامنه عدد موجی صفر تا ۴۰۰۰ cm-1 تعیین شد. -روش کشت *کاندیدا آلبیکنس*: جهت بررسی تاثیر نانوذرات بر *کاندیدا آلبیکنس* از سویه استاندارد IBRC-M3008 کشت داده‌شده در محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (مرک، آلمان) استفاده گردید. بدین منظور تلقیح از سویه مذکور در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس در مدت زمان بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت انجام و کلنی‌های به‌دست‌آمده به کمک سرم فیزیولوژی تا حدی رقیق شد که کدورتی معادل کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند ایجاد شود (تعداد مخمر در این مرحله  $10^8 \times 1/5$  CFU/ml بود).

-پیش‌آماده‌سازی نانوذرات: هر یک از نانوذرات پیش‌آماده‌سازی‌شده در محیط استیک اسید ۵ درصد به ترتیب در محیط کشت *کاندیدا* تهیه شدند. برای این منظور نانوذرات مس، نقره و کیتوسان و نیز نانوکامپوزیت مس-نقره-کایتوسان سنتز شده، به‌طور جداگانه به کمک ترازوی دقیق (سارتاریوس، آلمان) به میزان ۵۰ میلی‌گرم توزین شدند و سپس رقیق‌سازی آن‌ها با استفاده از محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل به گونه‌ای انجام گردید که در نهایت، غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰، ۱۲۸۰ و ۲۵۶۰ میلی‌گرم بر لیتر از آن‌ها ایجاد شد. تهیه محیط شاهد نیز با در نظر گرفتن غلظت صفر درصد برای نانوذره به شکل مشابه انجام شد (Karimiyan et al., 2015).

در ادامه ایجاد کاندیدیازیس با یک زمان‌بندی مشخص به شرح ذیل انجام شد:

الف) هفته اول: در این هفته برای این‌که حیوانات با شرایط محیط جدید عادت کنند و استرس ناشی از جابجایی نیز کاهش یابد، از ایمونوساپرس نمودن حیوانات اجتناب شد و آب و غذای کافی و عاری از عوامل ضد قارچی و شرایط کاملاً مناسب برای آن‌ها فراهم شد. وزن حیوانات به طور متوسط حدود ۲۰۰ گرم بود. در روز هفتم از دهان حیوانات توسط سواب استریل نمونه‌گیری به عمل آمد و حداقل مقدار کاندیدای قابل اغماض در فضای دهانی آن‌ها مشخص شد. این کار به منظور تعیین کمیت (تعداد میکروارگانسیم های موجود در یک میلی‌لیتر یا یک گرم ماده مورد نظر) برحسب (colony forming unit) CFU در محوطه دهانی آن‌ها قبل از سرکوب ایمنی انجام گردید.

ب) هفته دوم: در این هفته سیستم ایمنی موش‌های صحرائی با استفاده از سیکلوفسفامید سرکوب شد.

ج) هفته سوم: در طی این هفته در روزهای سوم، پنجم و هفتم، تلقیح سوسپانسیون کاندیدیائی در گروه‌های مورد نظر انجام شد. برای اطمینان از دقت در انجام کار در پایان هفته سوم، موش‌های صحرائی به طور مجدد توزین شدند. وزن آن دسته از موش‌های صحرائی که ایمنی آنها سرکوب شده بود، به طور متوسط ۶۵ گرم کاهش داشت ولی وزن موش‌های صحرائی غیرسرکوب‌شده سیستم ایمنی، به طور متوسط به ۲۸۰ گرم می‌رسید که این تفاوت وزنی، یکی از علایم ساپرس شدن سیستم ایمنی است. البته ریزش شدید مو، بزرگ‌شدن بیضه، اسهال و کاهش شدید تحرک و

لازم به ذکر است که تعداد ۸ سر موش صحرائی هم به عنوان ذخیره و جایگزین در نظر گرفته شده بود که در صورت مشاهده تلفات در حیوانات هر یک از ۵ گروه اصلی، جایگزین آن‌ها می‌شدند):

گروه اول شامل ۷ سر موش صحرائی با ایمنی سرکوب‌شده و مبتلا به کاندیدیازیس دهانی بود که با استفاده از نانوکامپوزیت مس (۱/۵ درصد مس) - نقره (۱ درصد نقره) - کیتوزان (Mirhosseini et al., 2016)، به مدت یک هفته تحت درمان قرار گرفتند.

گروه دوم شامل ۷ سر موش صحرائی با ایمنی سرکوب‌شده و مبتلا به کاندیدیازیس دهانی بود که توسط نیستاتین (جابر بن حیان، ایران) با دوز ۰/۵ میلی‌لیتر (۱۰۰۰۰۰ واحد در کیلوگرم) (Lyu et al., 2016)، به مدت یک هفته تحت درمان قرار گرفتند.

گروه سوم شامل ۷ سر موش صحرائی با ایمنی سرکوب‌شده و مبتلا به کاندیدیازیس دهانی بود که با نانوکامپوزیت مورد مطالعه به مدت یک هفته تحت درمان قرار گرفتند.

گروه چهارم شامل ۷ سر موش صحرائی مبتلا به کاندیدیازیس که سیستم ایمنی آنها با سیکلوفسفامید (باکستر، آلمان) با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق داخل صفاقی تضعیف شده بود (Abruzzo et al., 2000). این گروه برای مطالعه تاثیر عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی بر گسترش عفونت در نظر گرفته شده بودند.

گروه پنجم شامل ۷ سر موش صحرائی با ایمنی سرکوب‌شده اما غیرآلوده، که برای نشان دادن نقش تلقیح در نتایج تحقیق، به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بودند.

و با روش هماتوکسیلین-ائوزین (EA50oG6، پارس سنتر، ایران) رنگ‌آمیزی شدند.

در بررسی میکروسکوپی (Philips XL30 scanning microscope, Philips, Netherlands) مقاطع بافتی تهیه‌شده، شدت عفونت کاندیدائی به صورت: ۱- عدم وجود عفونت (نمره ۰)، که اثری از مخمر در مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی نبود، ۲- عفونت خفیف (نمره ۱)، به معنای حضور تعداد ۱ تا ۳۰ مخمر در مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی، ۳- عفونت متوسط (نمره ۲)، به معنی حضور تعداد ۳۱-۶۰ مخمر در مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی و ۴- عفونت شدید (نمره ۳)، به معنی حضور بیش از ۶۰ مخمر در مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی، درجه‌بندی شده و در نهایت هم میانگین نمرات پنج فیلد مورد بررسی، ثبت می‌گردید. میزان التهاب بافتی هم به صورت: ۱- عدم التهاب (نمره ۰)، به معنی عدم حضور سلول‌های التهابی در بافت‌های مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی، ۲- التهاب خفیف (نمره ۱)، به معنی حضور تعداد ۱-۱۰ سلول التهابی در بافت‌های مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی، ۳- التهاب متوسط (نمره ۲)، به معنی حضور تعداد ۱۱-۲۰ سلول التهابی در بافت‌های مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی و ۴- التهاب شدید (نمره ۳)، به معنی حضور بیش از ۲۰ سلول التهابی در بافت‌های مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی، درجه‌بندی می‌شدند (Zhang et al., 2015).

-**تحلیل آماری داده‌ها:** کلیه آزمایشات انجام‌شده در این مطالعه با دو بار تکرار صورت گرفت و داده‌های به‌دست آمده بر پایه طرح آزمایشی به صورت تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان گردید.

گوشه‌گیری هم از علائم و نشانه‌های سرکوب سیستم ایمنی می‌باشند. همچنین در این مرحله قسمت‌های مختلف دهان و زبان موش‌های صحرایی مورد معاینه قرار گرفت و علایم ایجاد کاندیدیازیس در آن‌ها مشخص شد.

سپس موش‌های مبتلا شده به کاندیدیازیس، با غلظت ۲۵-۲۵۰ ppm نانوکامپوزیت تحت تیمار قرار گرفتند. لازم به ذکر است که یک هفته تا ده روز موش‌ها جهت تکمیل درمان تحت تیمار قرار داشتند و غلظتی از نانوکامپوزیت که منجر به درمان موش‌های بیمار شد، تعیین گردید.

-**بررسی میزان عفونت (حضور مخمر کاندیدا آلبیکانس) و درجه‌بندی التهاب با استفاده از روش اصلاح‌شده ژانگ:** در روز هشتم درمان (۲۴ ساعت پس از آخرین دوز درمانی) موش‌های صحرایی توسط دوز کشنده اتر (مرک، آلمان)، به منظور آسان‌کشی و در نهایت رعایت اصول اخلاقی، کشته شدند. سپس با استفاده از پنبه الکل اطراف دهان و صورت آن‌ها ضد عفونی شده و مقاطع بافتی از سطح پشتی زبان حیوانات در گروه‌های مختلف تهیه شد. لازم به ذکر است که بدین منظور، نمونه‌های مذکور پس از خروج از دهان بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد (پاک‌آزما، ایران) قرار می‌گرفتند. سپس نمونه‌های فرمالینه، توسط الکل (پاک‌آزما، ایران) آب‌گیری و نیز با گزلیل (اوسینا شیمی، ایران) شفاف شده و توسط پارافین (پارس شیمی، ایران) قالب‌گیری می‌شدند. در نهایت هم از نمونه‌های درون قالب پارافینی، با استفاده از دستگاه میکروتوم (مدل DS840، ایران) برش‌های سریالی با ضخامت ۶ میکرون تهیه شده

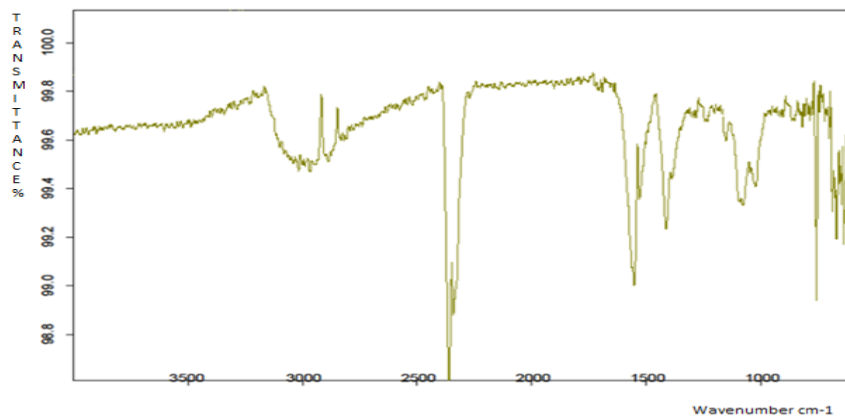
شده در ناحیه  $1080\text{ cm}^{-1}$  و  $1100\text{ cm}^{-1}$  هم به ارتعاش‌های کششی C-O-C در ساختار کایتوسان مربوط است. همچنین نوار کششی مشاهده شده در ناحیه  $1360\text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش کششی گروه عاملی C-O از عامل‌های الکلی موجود در ساختار کایتوسان مربوط می‌شود.

- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوکامپوزیت سنتز شده: نمای میکروسکوپی مربوط به نانوکامپوزیت تهیه شده در شکل ۲ ارائه شده است.

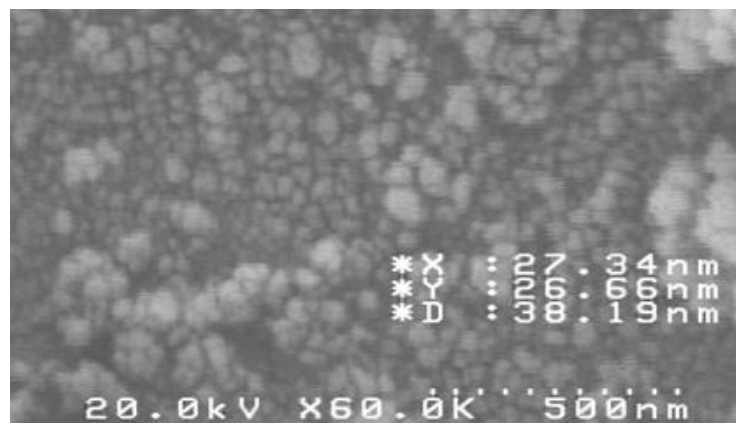
مقایسه داده‌ها با استفاده از تست من ویتنی صورت گرفت. در کلیه مراحل، مقدار  $p < 0/05$  به عنوان معیار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

-تفسیر طیف FT-IR مربوط به نانوکامپوزیت سنتز شده: همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نوار جذبی موجود در ناحیه  $550\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی Ag-O می‌باشد که نشان‌دهنده حضور نقره در ساختار نانوکامپوزیت می‌باشد. نوارهای کششی مشاهده



شکل ۱- طیف FT-IR نانوکامپوزیت مس- نقره - کایتوسان سنتز شده در تحقیق حاضر را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو کامپوزیت مس- نقره - کایتوسان سنتز شده را نشان می‌دهد.



کاهش تعداد کاندیداها و سلول‌های التهابی بود. همچنین تعداد سلول‌های التهابی در بافت‌های مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی موش‌های گروه با سرکوب ایمنی و مبتلا شده به کاندیدیازیس که درمانی برای آن‌ها صورت نگرفته بود، بسیار بیشتر از تعداد این سلول‌ها در در بافت‌های مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی موش‌های گروهی بود که با نانوذرات نقره-مس- کایتوسان درمان شده بودند.

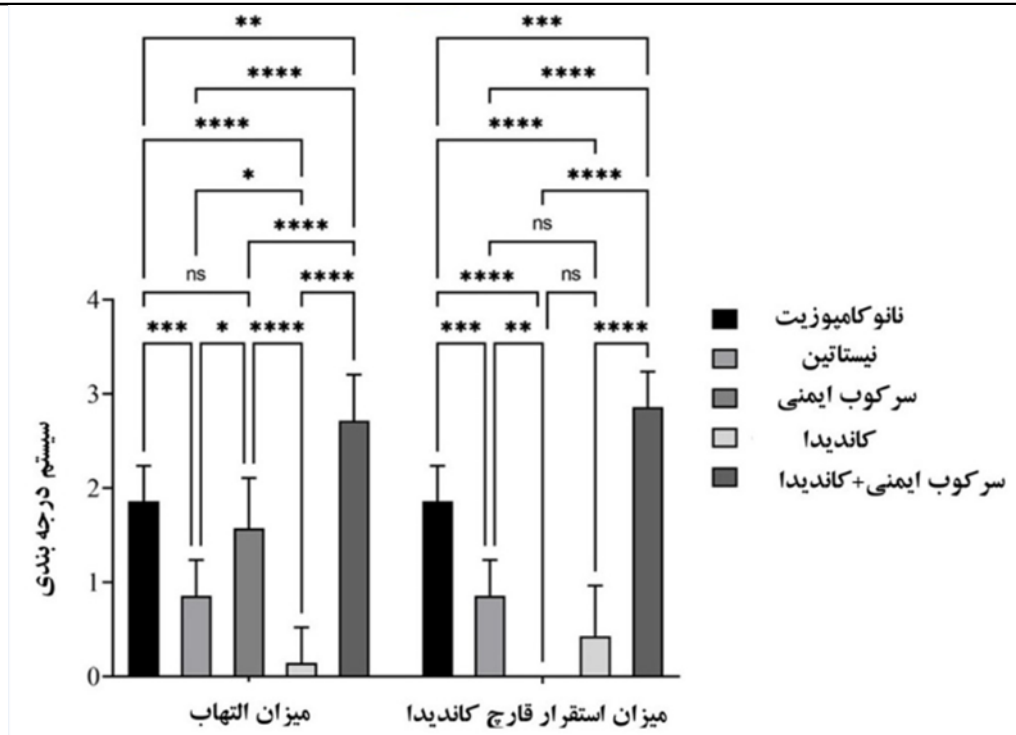
- نتایج بررسی میزان عفونت و التهاب بافتی با استفاده از روش اصلاح شده ژانگ: بر اساس یافته‌های به دست آمده که در جدول ۱ و نمودار ۱ و نیز اشکال ۳ تا ۶ ارائه شده، مشخص گردید که در بافت‌های مخاط و زیرمخاط محوطه دهانی موش‌های گروه با سرکوب ایمنی مبتلا به کاندیدیازیس که با نانوذرات سنتز شده، درمان شده بودند در مقایسه با موش‌های گروه درمان شده با نیستاتین، تعداد سلول‌های التهابی بیشتری دیده شد که به لحاظ آماری معنی دار بوده است ( $p < 0/05$ ). این امر نشان دهنده اثر قوی نیستاتین در

جدول ۱- میزان التهاب بافتی و عفونت کاندیدایی در گروه‌های مورد مطالعه

| گروه مورد مطالعه                                  | نمره التهاب بافتی | نمره میزان عفونت کاندیدایی |
|---------------------------------------------------|-------------------|----------------------------|
| گروه ۱ (سرکوب ایمنی + کاندیدیازیس + نانوکامپوزیت) | ۲                 | ۲                          |
| گروه ۲ (سرکوب ایمنی + کاندیدیازیس + نیستاتین)     | ۱                 | ۱                          |
| گروه ۳ (فقط سرکوب ایمنی)                          | ۲                 | ۰                          |
| گروه ۴ (فقط کاندیدیازیس)                          | ۰                 | ۰                          |
| گروه ۵ (سرکوب ایمنی + کاندیدیازیس بدون درمان)     | ۳                 | ۳                          |

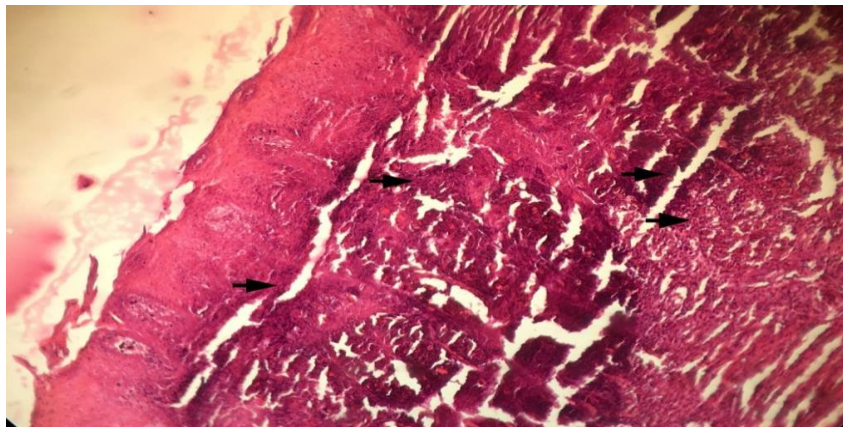
التهاب و تهاجم کاندیدا در گروه نیستاتین از همه کمتر و در گروه کاندیدیازیس همراه با سرکوب ایمنی از همه بیشتر است.

در نمودار ۱ درجه بندی هیستوپاتولوژیک میزان التهاب بافت پوششی دهان در گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود میزان

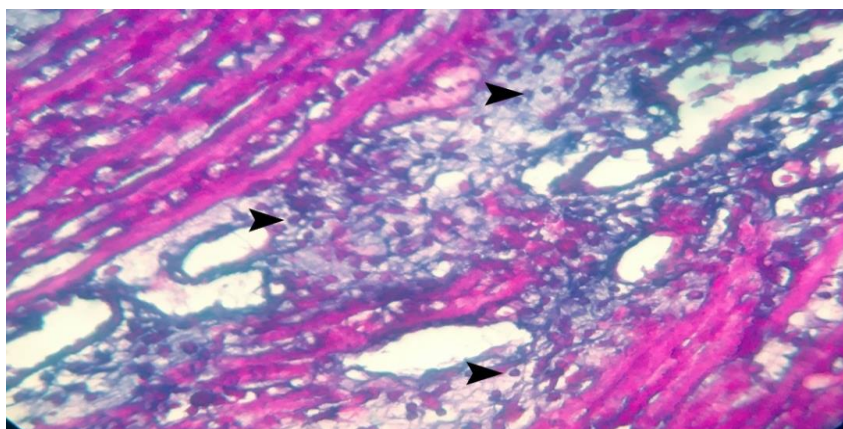


نمودار ۱- مقایسه میزان التهاب بافت پوششی دهان و استقرار قارچ کانديدا بین گروه‌های مختلف.

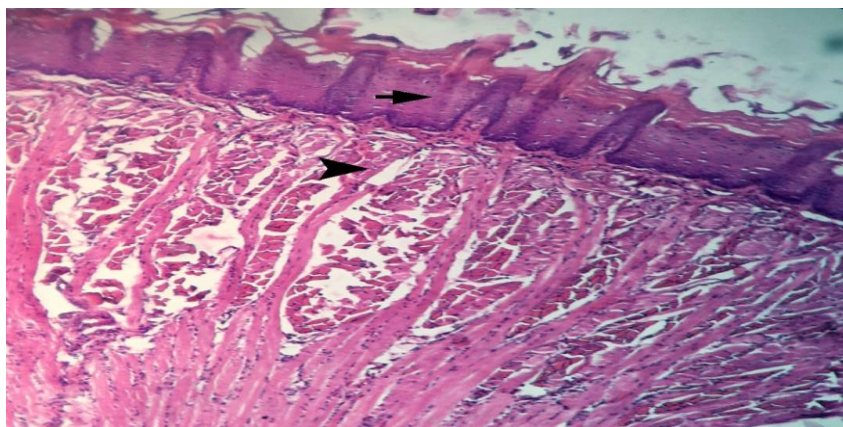
ns: بدون رابطه معنی‌دار، \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  (بالاترین میزان التهاب و استقرار قارچ)، \*\*\*:  $p < 0.0002$ ، \*\*:  $p < 0.002$ ، \*:  $p < 0.03$ .



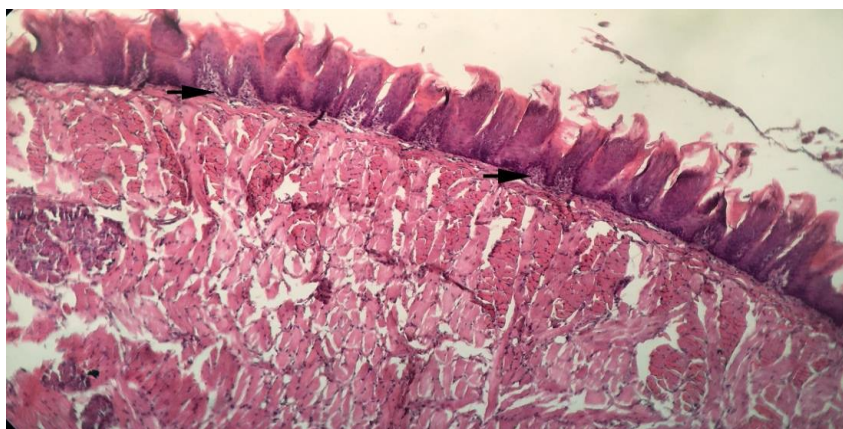
شکل ۳- نمای میکروسکوپی از بافت‌های مخاط و زیرمخاط دهان موش‌های گروه با سیستم ایمنی سرکوب‌شده + کاندیدایازیس بدون درمان که در آن حضور شدید سلول‌های التهابی (پیکان‌ها) مشاهده می‌گردد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی ۱۰۰×).



شکل ۴- نمای میکروسکوپی از بافت مخاط دهان موش های گروه با سیستم ایمنی سرکوب شده+ کاندیدا یازیس بدون درمان که در آن حضور فراوان مخمرها (نوک پیکانها) دیده می شود (رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف، درشت نمایی ۱۰۰×).



شکل ۵- نمای میکروسکوپی از ناحیه دهان موش های گروه کاندیدا یازیس که در آن عدم حضور سلول های التهابی در بافت های مخاطی (پیکان) و زیرمخاطی (نوک پیکان) قابل مشاهده می باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین ، درشت نمایی ۱۰۰×).



شکل ۶- نمای میکروسکوپی از ناحیه دهان موش های گروه با سیستم ایمنی سرکوب شده+ کاندیدا یازیس + درمان با نیستاتین که در آن حضور خفیف سلول های التهابی (پیکان) در بافت های مخاط و زیرمخاط دیده می شود (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین ، درشت نمایی ۱۰۰×).

## بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت قارچ کاندیدا و کاندیدیازیس از نظر طیف وسیع بیماری‌های که ایجاد می‌کند و نیز میزان بالای کشندگی عفونت‌های تهاجمی و سیستمیک ناشی از آن و با توجه به سیر فزاینده جمعیت بیماران در معرض خطر ابتلا به کاندیدیازیس، روش‌های مختلفی برای تولید داروهای موثر که کمترین مقاومت و مشکل دارویی را برای بیماران به همراه داشته باشد، بسیار مهم هستند. محدودیت انتخاب داروهای ضد قارچی یکی از مسائل مهم در درمان بیماری‌های قارچی می‌باشد.

گزارش شده که استفاده از نانوذرات جهت درمان عفونت‌های قارچی به دلیل غیرشیمیایی بودن آن‌ها، اثرات جانبی کمتری نسبت به داروهای که به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد، دارند و به نظر می‌رسد که قادر باشند به نحو موثری در درمان کاندیدیازیس هم مورد استفاده قرار گیرند (Lara et al., 2015; Kell et al., 2013).

در مطالعه حاضر، هدف سنتز نانو کامپوزیت مس-نقره-کایتوسان و بررسی اثر آن بر قارچ کاندیدا/آلبیکنس بود. بنابراین سنتز این ماده با تکنیک FT-IR تایید گردید و اندازه و موفولوژی نانوکامپوزیت سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد. پس از آن اثر درمان با نانوکامپوزیت مس-نقره-کایتوسان و نیستاتین بر روی ۵ گروه موش صحرائی بررسی شد. در این بررسی، اثر نانوذرات سنتز شده بر کاهش تعداد کاندیدا/آلبیکنس موجود در مخاط دهان موش‌های صحرائی که به طور تجربی به ضعف سیستم ایمنی و کاندیدیازیس مبتلا شده بودند مورد مطالعه قرار

گرفت. در نمونه مخاط گروه موش‌های با سرکوب ایمنی مبتلا به کاندیدیازیس که با نانوذرات سنتز شده درمان شده بودند، در مقایسه با گروه درمان شده با نیستاتین تعداد سلول‌های التهابی بیشتری دیده شد که نشان‌دهنده اثر قوی نیستاتین در کاهش کلونی کاندیدا و سلول‌های التهابی بود. با وجود اینکه نیستاتین به عنوان داروی انتخابی برای بیماران با ضعف سیستم ایمنی مبتلا به کاندیدیازیس مطرح است، اما به دلیل مقاومت‌های دارویی و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، در تحقیق حاضر سنتز نانوکامپوزیت مس-نقره-کایتوسان به عنوان جایگزین دارویی با نیستاتین انجام شد.

وجود بار مثبت روی نقره باعث تسهیل اثرات میکروبی‌کشی در نانوذرات نقره می‌گردد. از طرف دیگر رادیکال‌های آزاد تشکیل شده در سطح نانوذرات، باعث ایجاد آسیب در غشاء میکروارگانیسم می‌گردد. در تحقیقات پیشین مشخص شده است که اتصال یون‌های نقره به فیلم کیتوزان عملکرد فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کاندیدا/آلبیکنس را مختل نموده و باعث کاهش کلونی کاندیدا می‌گردد (Dananjaya et al., 2017). در تحقیق حاضر با سنتز نانوذرات مس-نقره-کیتوزان اثر بخشی دارو بر کاهش کلونی‌ها تشدید شده و در بررسی مخاط موش‌های تحت مطالعه این کاهش به خوبی مشاهده شد.

تحقیق بدیعی و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد که نانوذرات نقره متصل به کیتوزان فعالیت ضد میکروبی علیه تمام میکروبی‌های مورد بررسی (شریشیا کولای، کاندیدا/آلبیکنس و اسپرژیلوس) داشته‌اند (Badiei et al., 2018). افزایش خاصیت ضد میکروبی، با اتصال نانوذرات نقره و مس به کیتوسان نیز در برخی

بسیار خوب این نانو ذرات سنتز شده در کاهش التهاب و کاهش کلونی کاندیدا بود و همخوانی مطالعه حاضر با تحقیقات پیشین را نشان می‌دهد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران به خاطر تامین هزینه اجرای این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

از تحقیقات گذشته گزارش شد ( Haddadi *et al.*, 2018). نتایج ایشان مشابه مطالعه حاضر بود. نتایج بررسی حاضر حاکی از تاثیر بسیار خوب نانوکامپوزیت مس-نقره-کایتوسان در نابودی کاندیدا آلبیکنس و کاهش این قارچ بوده است.

در تحقیق ما، اثر ضد قارچی نانوذرات مس و نانوذرات کایتوسان به طور مجزا اثبات نشد، ولی بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که ترکیب آنها اثر هم‌افزایی اندکی داشته و مقداری هر چند اندک بر خصلت اثر ضد قارچی می‌افزاید. سلول‌های التهابی در گروه موش‌های با سرکوب ایمنی مبتلا به کاندیدیازیس که درمانی برای آن‌ها صورت نگرفته، بسیار بیشتر از تعداد این سلول‌ها در گروهی بود که با نانوذرات نقره-مس-کایتوسان درمان شده بودند که این امر بیانگر تاثیر

### منابع

- Abruzzo, G.K., Gill, C.J., Flattery, A.M., Kong, L., Leighton, C., Smith, J.G., *et al.* (2000). Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9): 2310-2318.
- Arancia, S., Carattoli, A., Lavallo, R., Cassone, A. and De Bernardis, F. (2006). Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in real time PCR identification of *Candida albicans* in biological samples. *Molecular and Cellular Probes*, 20(5): 263-268.
- Dananjaya, S., Kulatunga, D., Godahewa, G., Nikapitiya, C., Oh, C., Edussuriya, M., *et al.* (2017). Preparation, characterization, and antimicrobial properties of chitosan-silver nanocomposites films against fish pathogenic bacteria and fungi. *Indian Journal of Microbiology*, 57(4): 427-437.
- Ellepola, A.N. and Morrison, C.J. (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of Microbiology*, 43(1): 65-84.
- Friedman, D.Z. and Schwartz, I.S. (2019). Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. *Journal of Fungi*, 5(3): 67.
- Ghavidelaghdam, E., Narimanirad, M. and Lotfi, A. (2016). Effects of silver nanoparticles synthesized through chemical reduction on plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes in rat model. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 10(37): 69-79. [In Persian]

- Ghorbani, E. and Azadikhah, D. (2019). Identification and determination of prevalence of saprophytic fungi in the larval stage of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in hatcheries of west Azarbaijan province. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 13(49): 91-99. [In Persian]
- Haddadi, P., Khorshidi, H., Raoofi, S., Nazhvani, A. D. and Badiee, P. (2018). Comparative evaluation of conventional and nanosilver-containing leucocyte and platelet-rich fibrin/biomaterial in the anti-biofilm formation of standard species of *Candida* and *Streptococcus*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 11(8): 1-6. [In Persian].
- Javadi, A. Mirzaii, H. and Ebrahimi, I. (2009). Effect of probiotics in poultry diet on microbial hazards of poultry meat. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 3(9): 377-382. [In Persian]
- Karimiyan, A., Najafzadeh, H., Ghorbanpour, M. and Hekmati-Moghaddam, S.H. (2015). Antifungal effect of magnesium oxide, zinc oxide, silicon oxide and copper oxide nanoparticles against *Candida albicans*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(10): e2179.
- Kell, D.B., Dobson, P.D., Bilsland, E. and Oliver, S.G. (2013). The promiscuous binding of pharmaceutical drugs and their transporter-mediated uptake into cells: what we (need to) know and how we can do so. *Drug Discovery Today*, 18(5-6): 218-239.
- Lara, H. H., Romero-Urbina, D. G., Pierce, C., Lopez-Ribot, J. L., Arellano-Jiménez, M. J. and Jose-Yacaman, M. (2015). Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1): 1-12.
- Lyu, X., Zhao, C., Yan, Z.M. and Hua, H. (2016). Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10: 1161.
- Marins, T.A., Marra, A.R., Edmond, M.B., Martino, M.D.V., Yokota, P.K.O., Mafra, A.C.C.N., *et al.* (2018). Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. *BMC Infectious Diseases*, 18(1): 1-13.
- Mehraban, A., Nasr, R., Eslami, M. and Amrollahi, H. (2019). Molecular and morphological identification of fungi isolated from sour cherry, plum and apple fruit leather in Iran. *Gene Reports*, 17(4): 100500.
- Mirhosseini, M., Yazdani, K.N. and Dehgan, H.A. (2016). Investigation of antimicrobial properties of chitosan-ZnO Nano composite. *razi journal of medical sciences (journal of iran university of medical sciences)*, 23(147): 104-114. [In Persian].
- Ren, G., Hu, D., Cheng, E.W., Vargas-Reus, M.A., Reip, P. and Allaker, R.P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(6): 587-590.
- Shafiei, M., Ghasemian, A., Eslami, M., Nojoomi, F. and Rajabi-Vardanjani, H. (2019). Risk factors and control strategies for silicotuberculosis as an occupational disease. *New Microbes and New Infections*, 27(15): 75-77.
- Sütçü, M., Acar, M., Genç, G.E., Kökçü, İ., Aktürk, H., Atay, G., *et al.* (2017). Evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities among children with invasive candidiasis. *Turk Pediatri Arsivi*, 52(3): 145-153.
- Thanh, N.T. and Green, L.A. (2010). Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 5(3): 213-230.
- Yousefi, B., Eslami, M., Ghasemian, A., Kokhaei, P. and Sadeghnejhad, A. (2019a). Probiotics can really cure an autoimmune disease? *Gene Reports*. 15(2): 100364.
- Yousefi, B., Eslami, M., Ghasemian, A., Kokhaei, P., Salek Farrokhi, A. and Darabi, N. (2019b). Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6): 8008-8018.