مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره هشتم، شماره دوم، خرداد ـ تیر ۹۳
صفحه ٤٤ الی ٥٠

مقاله پژوهشی
(Original Article)

سنتز نانوذرات طلا و مطالعه تأثیرات ضدمیکروبی آن بر روی هلیکوباکتر پیلوری

حمید عبداللهی[۱]، علی جوادی[۲*]، محمدرضا زندمنفرد[۳]

چکیده

زمینه و هدف : هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری مارپیچ، گرم منفی و میکروآئروفیلیک است. این باکتری از عوامل اصلی ایجاد زخم معده می‌باشد. امروزه جهت درمان از چند دارو برای از بین بردن این باکتری استفاده می‌شود، که متأسفانه وجود مقاومت دارویی، درمان را دچار مشکل کرده است. استفاده از علم نانوتکنولوژی در پزشکی می‌تواند در آینده راه حل این مشکل باشد. از میان نانومتال‌ها، نانوذرات طلا دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که می‌توان از آن در کاربردهای پزشکی استفاده کرد. لذا این مطالعه با هدف بررسی تأثیر نانوذرات طلا بر روی ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری حساس و مقاوم به داروهای متداول درمانی انجام شد.

روش بررسی: ابتدا نانوذرات طلا به روش Turkevich سنتز شد، سپس خصوصیات اسپکتروفتومتری و میکروسکوپ الکترونی آنها مورد آنالیز قرار گرفت. فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری نانوذرات طلای خالص به روش دیسک دیفیوژن و طبق استانداردهای CLSI انجام شد.

یافته‌ها: اندازه نانوذرات طلا ۱۲nm-۱۰ و طول موج ماکزیمم نانوذرات طلا ۵۲۲nm به دست آمد. هیچ هاله عدم رشدی در اطراف دیسک‌های نانوذرات طلا در روش دیسک دیفیوژن در مورد ایزوله‌های حساس و مقاوم مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد غلظت پایین نانوذرات طلا بر روی ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری هیچ تأثیری ندارد.

کلید واژه‌ها: نانوذرات؛ عوامل ضدمیکروبی؛ هلیکوباکتر پیلوری.

[۱]دانشیار میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

[۲]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

[۳]کارشناس ارشد شیمی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
علی جوادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
arm1358@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۸

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Abdollahi H, Javadi A, Zand Monfared MR. Synthesis of gold nanoparticles and study of their antimicrobial effects study on *Helicobacter pylori*. Qom Univ Med Sci J 2014;8(2):44-50. [Full Text in Persian]

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، مارپیچ و میکروآئروفیلیک است. این باکتری در سال ۱۹۸۲ توسط Marshall Barry و Warren Robin کشف شد (۱). باکتری هلیکوباکتر پیلوری کلونیزه‌شده در مخاط معده؛ با داشتن آنزیم اوره‌آز، خود را از شرایط اسیدی معده حفظ می‌کند. شکل مارپیچی و قابلیت تحرک این باکتری نیز باعث نفوذ به لایه‌های زیرین مخاط می‌شود (۳،۲). تأمین شرایط رشد برای این باکتری در آزمایشگاه بسیار سخت است و رشد بهینه آن در حضور ۵-۲٪ اکسیژن و ۱۰-۵٪ دی‌اکسیدکربن به همراه رطوبت بالا تأمین می‌شود. درجه حرارت رشد بین ۴۰-۳۰°C با بهینه ۳۷°C و pH مناسب حدود خنثی می‌باشد. حدود ۵۰٪ افراد دنیا دچار التهاب معده و زخم معده هستند (۴). این باکتری در حالت مزمن توانایی ایجاد آدنو کارسینوما را نیز دارد (۶،۵). ارتباط این باکتری با زخم معده در مطالعات قبلی بررسی شده است، اکنون نیز ثابت شده عامل اصلی این بیماری باکتری هلیکوباکتر می‌باشد. همچنین فاکتورهای ویرولانس این باکتری، از جمله Cag A، Vac A و آسیب‌های مکانیکی در موکوس، در ایجاد بیماری نقش دارند (۸،۷).

جهت درمان بیماری و از بین بردن باکتری، از رژیم‌های چند دارویی استفاده می‌شود برای مثال در این بیماری، آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین به همراه مترونیدازول و کلاریترومایسین و یک مهارکننده پمپ پروتونی مانند امپرازول یا پنتاپرازول تجویز می‌گردد. متأسفانه بروز مقاومت دارویی در این باکتری باعث شده است تا درمان آن دچار مشکل شود، همچنین با توجه به اینکه این باکتری در ایجاد زخم معده و در نهایت سرطان معده نقش دارد، بنابراین، استفاده از روش‌های جدید در درمان آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۰،۹). استفاده از علم نانوتکنولوژی در پزشکی نیز می‌تواند در آینده در رفع این مشکل به بشر کمک نماید. از آنجا که نانوذرات، پایه و اساس نانوتکنولوژی می‌باشد، لذا استفاده از آنها در پزشکی، چشم‌انداز جدیدی را در مبارزه برعلیه باکتری‌های پاتوژن باز نموده است (۱۲،۱۱).

جهت این امر، ابتدا باید فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات را سنجیده، سپس در صورت امکان برای مصارف دارویی از آن استفاده کرد. انواعی از نانوذرات مانند نانوسیلور، نانوتیتانیوم و نانوذرات روی دارای فعالیت آنتی‌باکتریال هستند (۱۳،۱۲). از بین نانوذرات، نانوذرات طلا خصوصیات منحصر به فردی دارد که می‌توان از آن در کاربردهای مختلف پزشکی استفاده کرد. نانوذرات طلا اندازه‌ای بین ۱-۱۰۰nm دارد و سطح زیاد آن نسبت به حجم باعث واکنش بهتر این ذرات با بیومولکول‌ها می‌شود (۱۳). از کاربردهای این ذرات می‌توان به استفاده از آنها به‌عنوان بیوسنسورها و برچسب‌های بیولوژیکی فلورسانس اشاره نمود. همچنین در فرآیند تحویل دارو و ژن، ردیابی پاتوژن‌ها و افزایش فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های کونژوگه با آن و در فتوترمال‌تراپی تومورها کاربرد دارد (۱۴).

سهولت ساخت نانوذرات طلا و سمّیت کمتر آن نسبت به نانو مواد دیگر، استفاده از آن را در جنبه‌های درمانی و تشخیصی پراهمیت نموده است (۱۳). Grace و همکاران (سال ۲۰۰۷) در مطالعه خود، نانوذرات طلا را سنتز نموده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن را مورد بررسی و سپس تأثیر ضدمیکروبی نانوذرات را به روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزا*، *میکوکوکوس لوتئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* مطالعه نمودند. میانگین اندازه نانوذرات طلا در این مطالعه ۱۲-۱۵nm و نیز غلظت ۰/۵mM بود، همچنین عنوان کردند در این غلظت، نانوذرات طلا هیچ تأثیر ضدمیکروبی نداشته است (۱۲). Nzari و همکاران (سال ۲۰۱۲) اثر نانوذرات طلا را بر روی *سودوموناس آئروجینوزا* مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی نمودند. در این مطالعه نانوذرات طلا از نظر اندازه، ۲-۱۰۰nm بود. در این بررسی تست ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن از غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا نیز انجام شد، که هاله عدم رشد در غلظت‌های ۳۱/۲۵-۵۰۰µg/disk مشاهده نشد (۱۴). در مطالعه حاضر توسط احیای شیمیایی با استفاده از تری‌سیترات سدیم، ابتدا نانوذرات طلا سنتز شده و پس از بررسی ویژگی‌های آن نظیر خصوصیات اسپکتروفتومتری و خصوصیات میکروسکوپ الکترونی، فعالیت ضدباکتریایی آن به

روش دیسک دیفیوژن، علیه ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری جداشده از نمونه‌های بیوپسی بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت.

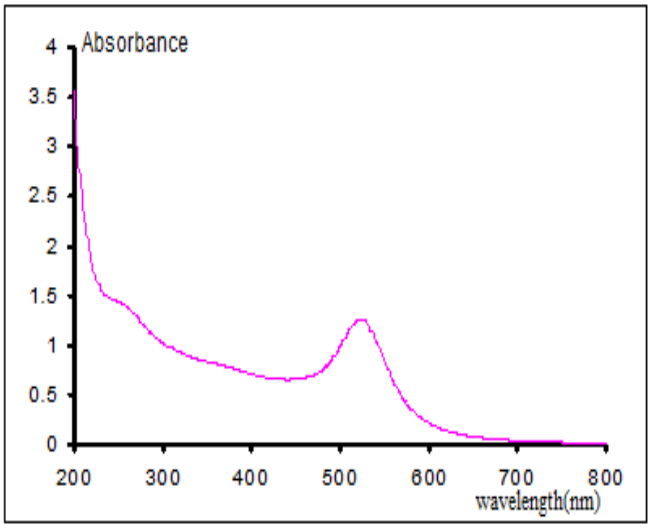
روش بررسی

برای سنتز نانوذرات طلا از $HAuCl_4$ (آلفا ایسر، آمریکا) تری‌سیترات سدیم (مرک، آلمان) استفاده شد. همچنین جهت کشت باکتری‌ها از محیط بروسلا آگار (مرک، آلمان) حاوی خون گوسفندی و ساپلیمنت آنتی‌بیوتیکی شامل تری‌متو پریم (مرک، آلمان)، آمفوتریسین (مرک، آلمان)، ونکومایسین (مرک، آلمان) استفاده گردید . جهت ایجاد شرایط میکروآئروفیلیک و رشد باکتری‌ها، گاز پک نوع C به کار برده شد. جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات طلا نیز از محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک) به همراه ۵٪ خون گوسفند استفاده شد. همچنین از باکتری‌های جداشده از بیوپسی بیماران مبتلا به گاستریت که در مطالعه دکتر عبداللهی و همکاران (سال ۲۰۱۱) از نظر تست‌های بیوشیمیایی و آنتی‌بیوگرام مورد شناسایی قرار گرفته بود، استفاده گردید (۱). برای سنتز نانوذرات طلا به روش احیای شیمیایی (Turkevich Method)، ابتدا ۲/۵ml از محلول استوک $HAuCl_4$ را داخل ارلن ریخته و سپس ۹۲/۵CC آب ۲ بار تقطیر به آن اضافه شد، سپس هات پلیت را روشن کرده تا محلول به جوش آید، در ادامه، با روشن کردن همزن، قطره قطره به میزان ۲/۵ml تری‌سیترات سدیم اضافه شد و پس از ایجاد رنگ قرمز یاقوتی دستگاه خاموش و محلول موردنظر، در ظرف تیره در 4^oC نگهداری شد. غلظت نانوذرات طلا در این حالت ۰/۵mM به دست آمد (۱۲). پس از سانتریفوژ در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و خشک‌کردن نمونه، مقادیر متفاوت نانوذرات طلا تهیه و دیسک‌های کاغذی به آنها آغشته و در آزمایشهای ضدمیکروبی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین جهت بررسی طول موج ماکزیمم جذب نانوذرات طلا، از دستگاه اسپکتروفتومتر Cary100 استفاده شد. در ادامه، ابتدا دستگاه را با آب به‌عنوان بلانک صفر کرده، سپس محلول سنتزشده درون کووت ریخته شد و ماکزیمم جذب آن به همراه طیف ترسیم گردید. جهت تعیین شکل و عکسبرداری، از میکروسکوپ الکترونی TEM مدل LEO912-AB تحت پتانسیل ۱۲۰KeV استفاده شد.

در ادامه، مقداری از محلول نانوذرات طلا را روی گرید مسی ریخته، و پس از خشک شدن توسط دستگاه، عکس نانوذرات گرفته شد (۱۲). جهت تعیین سایز و پراکندگی ذرات از نظر اندازه نیز دستگاه ZS (Zeta Sizer Nano) (مدل Zen3600، Malvern، انگلستان) به کار برده شد. پس از سنتز و بررسی صحت وجود نانوذرات طلا، از ۶ باکتری هلیکوباکتر پیلوری جداشده از بیوپسی بیماران طبق استانداردهای CLSI شامل یک ایزوله حساس و یک ایزوله مقاوم به هر دارو (مترونیدازول، کلاریترومایسین، آموکسی‌سیلین) (جدول شماره ۱)، در محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند، کشت انبوه تهیه شد. در ادامه، دیسک‌های کاغذی آغشته به غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰µg/disk) روی کشت باکتری‌ها قرار گرفتند، سپس پلیت‌ها را درون جار بی‌هوازی حاوی گاز پک نوع C (مرک، آلمان) جهت تأمین شرایط میکروآئروفیلیک گذاشته تا در دمای 37^oC به مدت ۵ روز انکوبه شوند. در نهایت، بعد از ۵ روز نتایج ضدمیکروبی مورد بررسی قرار گرفت (۱۵).

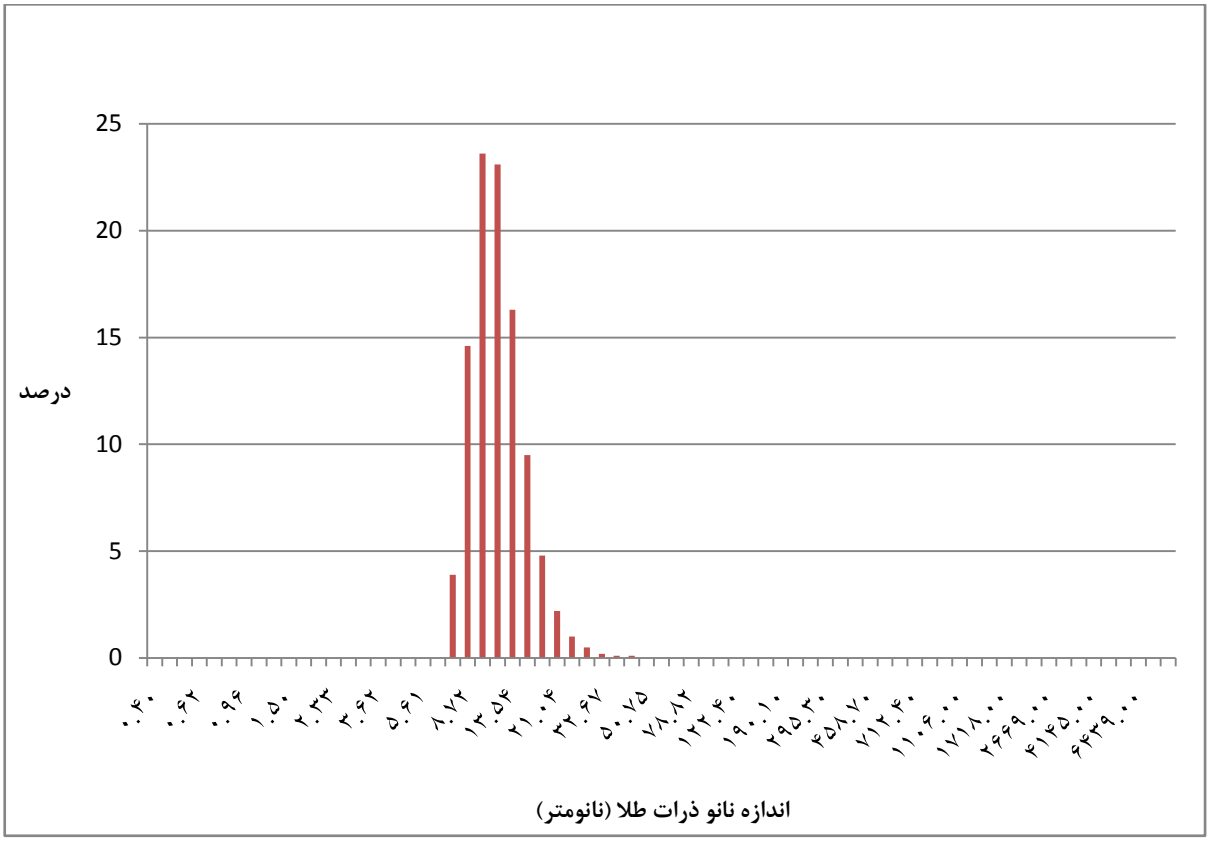
یافته‌ها

نانوذرات طلا توسط روش احیای شیمیایی توسط تری‌سیترات سدیم (روش Turkevich) سنتز و محلول قرمز یاقوتی به دست آمد. طول موج ماکزیمم جذب نانوذرات طلا توسط اسپکتروفتومتری ۵۲۲nm تعیین گردید (نمودار شماره۱) .



نمودار شماره ۱: طول موج ماکزیمم جذب نانوذرات طلا

در شکل میکروسکوپ الکترونی، اشکال کروی نانوذرات طلا به‌وضوح مشخص می‌باشد و با دستگاه Zeta Sizer Nano اندازه حدود ۱۰nm، بیشترین پراکندگی را نشان می‌دهد که حدود ۲۳/۶٪ بوده است و کمترین مقدار نیز مربوط به اندازه ۴۲/۸۲nm می‌باشد که ۱٪ را به خود اختصاص می‌دهد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره۲: فراوانی نانوذرات طلا براساس اندازه

در این مطالعه تأثیرات ضدهلیکوباکتریایی داروها هریک به تنهایی انجام شد (جدول)، که طبق استانداردهای CLSI از نظر تست آنتی‌بیوگرام برای مترونیدازول قطر هاله ۲۱< و ۱۶≤ به ترتیب ایزوله حساس و مقاوم در نظر گرفته شد. برای آموکسی‌سیلین نیز قطر هاله ۱۸< و ۱۸≤ به ترتیب ایزوله حساس و مقاوم تلقی شد و از نظر مقاومت و حساسیت به کلاریترومایسین قطر هاله ۳۰< و ۳۰≤ به ترتیب ایزوله حساس و مقاوم بودند. تأثیر نانوذرات طلا بر روی ایزوله‌ها در روش دیسک دیفیوژن نشان داد نانوذرات طلا در غلظت‌های مورد مطالعه، تأثیر ضدهلیکوباکتریایی بر روی هیچ‌یک از ایزوله‌های حساس و مقاوم به دارو نداشته، همچنین در این غلظت‌ها، اطراف دیسک آغشته به نانوذرات طلا، هاله عدم رشدی مشاهده نشده است.

جدول: نتایج تست آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری

*ایزوله حساس	آموکسی‌سیلین	مترونیدازول	کلاریترومایسین
H. pylori (1)	۳۴mm	–	–
H. pylori (2)	–	۲۳mm	–
H. pylori (3)	–	–	۳۲mm
***ایزوله مقاوم**	**آموکسی‌سیلین**	**مترونیدازول**	**کلاریترومایسین**
H. pylori (4)	۱۰mm	–	–
H. pylori (5)	–	صفر	–
H. pylori (6)	–	–	۱۶mm

***هرایزوله برای هر دارو به تنهایی مورد آزمایش آنتی‌بیوگرام قرار گرفته است.**

– عدم انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام در مورد دارو

بحث

نانوذرات طلا به‌طور معمول دارای سایزی در حدود ۱–۱۰۰nm است. بیشتر روش‌های سنتز نانوذرات طلا برپایه احیای ترکیب $HAuCl_4$ توسط عوامل احیاکننده استوار است. در اثر احیای شیمیایی به روش Turkevich توسط تری‌سیترات سدیم؛ آنیون‌های سیترات بر سطح نانوذرات Au^0 قرار می‌گیرند و شارژ منفی را در سطح نانوذرات طلا القا می‌کنند (۱۲). در این مطالعه غلظت نهایی نانوذرات طلا ۰/۵mM به دست آمد و از نظر تأثیر ضدهلیکوباکتریایی به روش دیسک دیفیوژن، هیچ هاله عدم رشدی در اطراف دیسک‌های آغشته با نانوذرات و در اطراف ایزوله‌های حساس و مقاوم به دارو یافت نشد. Grace و همکاران (سال ۲۰۰۷) نیز در تحقیق خود ابتدا نانوذرات طلا را سنتز نموده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن را بررسی و سپس تأثیر ضدمیکروبی نانوذرات و حالت‌های کونژوگه دارو با نانوذرات را مطالعه نمودند. در این مطالعه ماکزیمم طول موج نانوذرات طلا ۵۱۸ و میانگین اندازه ۱۲–۱۵nm گزارش شد، همچنین آنها با تهیه غلظت ۰/۵mM از نانوذرات طلا، عنوان کردند در این غلظت نانوذرات طلا هیچ تأثیر ضدمیکروبی بر روی باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزا*، *میکوکوکوس لوتئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* ندارد (۱۲). Hernandez و همکاران (سال ۲۰۰۸) در مطالعه خود با عنوان "تأثیر ضدباکتریایی نانوذرات طلا، روی و نقره، از سدیم بورهیدراید به‌عنوان احیاکننده استفاده و نانوذرات طلا را سنتز نمودند. اندازه نانوذرات طلا ۸۵nm بود و جهت تعیین MIC از روش میکرودایلوشن استفاده کردند. در نتایجی که در مطالعه آنها به دست آمد، MIC و MBC نانوذرات طلا برای *استرپتوکوکوس موتانس* ۱۹۷µg/ml گزارش شد. آنها عنوان کردند نانوطلا نسبت به نانوذرات‌های دیگر، تأثیر ضدمیکروبی ضعیفی بر روی میکروارگانسیم‌ها دارد (۱۳). Nazari و همکاران (سال ۲۰۱۲) نیز اثر نانوذرات طلا را بر روی *سودوموناس آئروجینوزا* مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی نمودند. آنها جهت سنتز نانوذرات طلا، روش Tannin Free Ethanol Extract را به کار بردند و از این ترکیب جهت احیای $HAuCl_4$ و سنتز نانوذرات طلا استفاده کردند. با بررسی خصوصیات اسپکتروفتومتری، طول موج ۵۲۷nm به دست آمد و پراکندگی نانوذرات از نظر اندازه ۲–۱۰۰nm بود.

همچنین با انجام تست ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن از غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا؛ هاله عدم رشد در غلظت‌های ۳۱/۲۵–۵۰۰µg/disk مشاهده نشد و در غلظت‌های ۱۰۰۰µg/disk و بالاتر، هاله عدم رشد قابل رؤیت بود. بنابراین براساس نتایج، آنها گزارش کردند نانوذرات طلا هنگامی‌که آنتی‌بیوتیک با سطح آن واکنش داده و به شکل پایدار کونژوگه می‌شود می‌تواند تأثیر ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش داده که خود به تنهایی تأثیر ضدمیکروبی ناچیزی دارد (۱۴). در مطالعه حاضر نیز طبق یافته‌های سایر پژوهشگران، تأثیر ضدهلیکوباکتریایی نانوذرات طلا در غلظت مورد مطالعه بر روی هیچ‌کدام از ایزوله‌ها مشاهده نشد. در نهایت، می‌توان عنوان نمود نانوذرات طلا نسبت به نانوذرات دیگر، تأثیر کمتری بر روی هلیکوباکتر پیلوری دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات طلا در غلظت‌های مورد بررسی بر روی هیچ‌کدام از ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری حساس و مقاوم به دارو، تأثیری ندارد.

References:

1. Abdollahi H, Savari M, Zahedi MJ, Darvish Moghadam S, Hayatbakhsh Abasi M. A study of rdxA gene deletion in metronidazole resistant and sensitive Helicobacter pylori isolates in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol 2011,4(2):99-104. [Full Text in Persian]

2. Alarcon T, Domingo D, Lopez-brea M. Antibiotic resistance problems with Helicobacter pylori. Int J Antimicrob Agents 1999;12(1):19-26.

3. Atherton JC. Non-endoscopic tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection. Aliment Pharmacol Ther 1997 Apr; 11Suppl 1:11-20.

4. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. Helicobacter pylori. Clin Microbiol Rev 1997;10(4):720-25.

5. Canton R, Martin de argila C, De rafael L, Baquero F. Antimicrobial resistance in Helicobacter pylori. Rev Med Microbiol 2001;12;47-61.

6. Cogo LL, Monteiro CL, Miguel MD, Miguel OG, Cunico MM, Ribeiro ML, et al. Anti-Helicobacter pylori activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. Braz J Microbiol 2010 Apr; 41(2):304-9.

7. Con SA, Takeuchi H, Nishioka M, Morimoto N, Sugiura T, Yasuda N, et al. Clinical relevance of Helicobacter pylori babA2 and babA2/B in Costa Rica and Japan. World J Gastroenterol 2010 Jan; 16(4):474-8.

8. Fallone CA. Epidemiology of the antibiotic resistance of Helicobacter pylori in Canada. Can J Gastroenterol 2000 Nov; 14(10):879-82.

9. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: Molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis 2006 Nov; 6(11):699-709.

10. Grayson ML, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, Moellering RC Jr. Effect of varying pH on the susceptibility of Campylobacter pylori to antimicrobial agents. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989 Oct; 8(10):888-9.

11. Chen WY, Lin JY, Chen WJ, Luo L, Wei-Guang Diau E, Chen YC. Functional gold nanoclusters as antimicrobial agents for antibiotic-resistant bacteria. Nanomedicine (Lond) 2010 Jul; 5(5):755-64.

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

13. Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén Ade J, et al. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutants to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine 2008 Sep; 4(3): 237-40.

14. Nazari ZE, Banoee M, Sepahi AA, Rafii F, Shahverdi AR. The combination effects of trivalent gold ions and gold nanoparticles with different antibiotics against resistant Pseudomonas aeruginosa. Gold Bull 2012Apr; 1-7.

15. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement. Clinical Laboratory Standards Institute 2010:165-71.