



افزایش اثر ضد قارچی نانو ذرات سلنیوم بیوستنز شده با استفاده از آسپرزیلوس فومیگاتوس

حمید صادقیان^۱، حسین زرین فر^۲، هادی صفدری^۳، محمدحسین احمدی^۴، مائده طه‌هان^۴، مهدی حسینی بافقی^{۵*}

۱- دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۲- دانشیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۳- استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۵- دکترای Ph.D. میکروبیولوژی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۸

چکیده

مقدمه: سنتزهای سبز (زیستی) به عنوان روش‌های جدید سنتز نانو ذرات با رویکردی ساده، زیست سازگار، بی خطر و اقتصادی می‌توانند جایگزین روش‌های شیمیایی و فیزیکی باشند. قارچ‌ها قادر به تبدیل برخی یون‌های سمی به اشکال کمتر سمی، از جمله نانو ذرات هستند. نانو ذرات با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر دارای خواص کوانتومی منحصر به فرد می‌باشند. امروزه معضلات مقاومت‌های دارویی در گونه‌های مختلفی از قارچ‌ها دیده می‌شود. نانو ذرات سلنیوم (SeNPs) از موادی هستند که خاصیت ضد قارچی آنها گزارش شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات سلنیوم بیوستنز شده با استفاده از آسپرزیلوس فومیگاتوس بود.

مواد و روش‌ها: به این منظور SeNPs به کمک قارچ آسپرزیلوس فومیگاتوس با غلظت مشخص بیوستنز شدند. حضور نانو ذرات با روش‌های مختلف از جمله *DLS*، *XRD*، *EDX*، *FE-SEM*، *FT-IR*، *UV-Vis* و *Zeta potential* اثبات شد. سپس تعیین حساسیت بر اساس حداقل غلظت بازدارندگی رشد به کمک تست *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* بر روی سویه‌های استاندارد قارچی تیمار شده با SeNPs انجام شد.

نتایج: پس از تأیید نتایج حاصل از بیوستنز نانو ذرات، MIC برای ایتراکونازول و آمفوتریسین B علیه سویه‌های استاندارد قارچی مورد مطالعه به ترتیب ۸ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در حالی که مقادیر MIC برای نمونه‌های تیمار شده با SeNPs به ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و کمتر از آن کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به ایجاد روند صعودی مقاومت قارچ‌های فرصت‌طلب نسبت به داروهای ضد قارچی هدف، به کارگیری نانو ذرات سلنیوم زیستی حتی در غلظت‌های پایین نیز می‌تواند اثرات بازدارندگی مطلوبی بر روی رشد عوامل بیماری‌زای قارچی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سنتز سبز، نانو ذرات سلنیوم، آسپرزیلوس، مقاومت دارویی، MIC.

*نویسنده مسئول : ایران، مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، دانشکده علوم پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، تلفن: ۰۹۱۵۵۱۷۹۹۲۷، شماره: ۰۵۱۳۸۸۴۶۷۲۸، Email: m_hosseini79@yahoo.com

ارجاع: صادقیان حمید، زرین فر حسین، صفدری هادی، احمدی محمدحسین، طه‌هان مائده، حسینی بافقی مهدی. افزایش اثر ضد قارچی نانو ذرات سلنیوم بیوستنز شده با استفاده از آسپرزیلوس فومیگاتوس. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛ ۱۷(۳): ۴۰-۵۱.

مقدمه

سنتزهای زیستی (سبز) به عنوان روش‌های جدید سنتز نانو ذرات می‌توانند جایگزین روش‌های شیمیایی و فیزیکی باشند. تحقیقات متمرکز با استفاده از این مزیت برای سنتز نانو ذرات، یک رویکرد ساده، زیست سازگار، بی‌خطر و اقتصادی است (۱). به تازگی محققان منابع بیولوژیکی مختلفی را برای سنتز نانو ذرات پیشنهاد کرده‌اند؛ به گونه‌ای که مواد مؤثره و متابولیت‌های احیاکننده تعداد زیادی از ارگانیسیم‌های زنده، مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، گیاهان و عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانو ذرات مختلف به عنوان واسطه انتخاب می‌شوند (۲ و ۳). موجودات بیولوژیکی مانند گیاهان، قارچ‌ها یا باکتری‌ها قادر به تبدیل برخی یون‌های سمی به اشکال با سمیت بسیار پایین‌تر، از جمله رسوبات و یا نانو ذرات هستند. در سال‌های اخیر، سیستم‌های قارچی به عنوان کارخانه زیستی شناخته شده‌اند که می‌توانند نانو ذرات فلزی مثل نقره، طلا، روی، پلاتینیوم و کادمیوم را تولید کنند. فرآیندی که قارچ‌ها نانو ذرات فلزی را سنتز می‌کنند، میکوفابریکیشن گفته می‌شود (۴). نانو ذرات در اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به دلیل دارا بودن خواص کوانتومی و ویژگی‌های منحصر به فرد شیمیایی و فیزیکی، کاربردهای فراوانی در علوم پزشکی دارند (۵). مزایای کلی استفاده از نانو ذرات عبارت‌اند از: توانایی دستکاری خواص فیزیکی و شیمیایی ذرات مانند مورفولوژی، اندازه، توانایی سازگار کردن یک ذره معین به منظور مقاومت در برابر محیط آنزیمی، بهبود فراهمی زیستی، قابلیت جذب سلولی، تحرک بالا نسبت به ریزذرات، پایداری و کنترل در سیستم‌های رهایش دارو، عملکرد چندگانه در نانو پزشکی، سمیت کمتر در مقایسه با سایر ترکیبات، افزایش پایداری مواد مغذی با محافظت از آنها در محیط‌های اسیدی و بازی قوی و ظرفیت حمل بالا (۶). اگرچه هنوز برخی از مکانیسم‌های خاص ضد میکروبی نانو ذرات به خوبی مشخص نشده‌اند، اما این نانو ذرات می‌توانند با اتصال به دیواره و غشای سلول‌ها و نفوذ به داخل آنها، به ساختارهای سلولی آسیب برسانند و باعث القای تولید گروه‌های فعال اکسیژن و تغییر مکانیسم‌های انتقال سیگنال در سلول گردند (۷ و ۸). همچنین نانو ذرات ممکن است با تولید آدنوزین تری فسفات، بیان پروتئین‌های مرتبط را سرکوب کنند (۹ و ۱۰). اخیراً معضلات مقاومت‌های دارویی در گونه‌های مختلف از میکروارگانیسم‌ها دیده می‌شود. به عنوان مثال گونه‌های مختلف قارچ‌های رشته‌ای اسپریلیوس، می‌توانند در افراد سرکوب شده سیستم ایمنی به عنوان عوامل فرصت طلب بیماری‌زای انسانی عمل کنند (۱۱). اسپوره‌های این قارچ‌ها در آب، هوا، غذا و گرد و غبار وجود دارند که به عنوان آلرژن‌های قارچی در نظر گرفته می‌شوند (۱۲) و استنشاق کونیدی‌های آنها ممکن است بیماری‌های مهاجم مخاطره‌آمیزی در ریه، سینوس‌ها و

عفونت‌های منتشر به سایر اندام‌ها ایجاد کند (۱۳). اسپریلیوس تهاجمی ریوی حاد، عفونت شدید و کشنده‌ای است که در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، نوتروپنی، گرانولوماتوز مزمن، بدخیمی‌های خونی، شیمی‌درمانی، دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان و سایر بافت‌ها و همچنین در موارد استفاده طولانی مدت از استروئیدها و آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده می‌شود (۱۴ و ۱۵). گونه‌های اسپریلیوس همچنین نقش مهمی در عفونت‌های سیستمیک بیمارستانی دارا هستند (۱۶). با وجود درصد ناچیز (حدود ۱ درصد) از عوامل عفونت‌های بیمارستانی قارچی، این قارچ‌ها به عنوان عامل اصلی نگرانی در عفونت‌های بیمارستانی هستند و عفونت‌های اسپریلیوس مهاجم تا ۹۰ درصد موجب مرگ و میر می‌شوند (۱۷). در درمان این عوامل قارچی گروه‌های مختلف داروهای ضد قارچی از جمله داروهای گروه آزول (مثل ایتراکونازول، کتوکونازول و فلوکونازول) و داروهای گروه پلی آن (مثل آمفوتریسین B) با مصرف وسیع کاربرد دارند، که میکروارگانیسم‌های مذکور تا حدودی نسبت به آنها مقاوم شده‌اند (۱۸). نانو ذرات سلنیوم از موادی هستند که خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد انگلی آنها گزارش شده است (۱۹). سلنیوم به عنوان یک ریزمغذی از عناصر مورد نیاز و ضروری بدن بوده و تأثیر نانو ذرات سلنیوم بر سلامت انسان به دلیل سازگاری و بی‌خطر بودن مطرح می‌باشد (۲۰). همچنین مزایای استفاده از نانو ذرات سلنیوم عبارت‌اند از: خواص زیست پزشکی در تشخیص و درمان، ضد دیابت، تقویت و تعادل سیستم ایمنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، موثر در درمان کبد چرب، اثرات مثبت روی هضم غذا، پیشگیری از سرطان، خواص ضد قارچی، بهبود توانایی یادگیری، نقش در تولید مثل و خواص ضد باکتریایی (۲۱). لذا به کارگیری نانو ذرات سلنیوم سنتز شده به روش زیستی به عنوان عوامل ضد میکروبی و بررسی اثر این نانو ذرات بر روی رشد عوامل قارچی بیماری‌زا با توجه مشکلات مقاومت‌های دارویی ایجاد شده توسط این میکروارگانیسم‌ها، می‌تواند مورد بررسی و کاربرد قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های استاندارد قارچی مورد استفاده در این مطالعه از گروه قارچ‌های رشته‌ای اسپریلیوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) و اسپریلیوس فلاووس (*A. flavus*) می‌باشند و عبارتند از: *A. fumigatus*: TIMML-026، *A. fumigatus*: TIMML-025، *A. flavus*: TIMML-379 و *A. flavus*: TIMML-050 که از بخش استانداردسازی گروه قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند.

نانو ذرات سلنیوم به روش زیستی (سبز) و به کمک یک سویه استاندارد از قارچ رشته‌ای اسپریلیوس فومیگاتوس به نام *A.*

شده فراهم شود. تعیین اندازه نانو ذرات توسط دستگاه پراکندگی دینامیک نور ((Dynamic light scattering (DLS)) شرکت فرانسوی Cordouan مدل Vasco3 و پتانسیل زتای آنها توسط دستگاه شرکت CAD. ساخت کشور فرانسه، مدل Zeta Compact به دست آمد. همچنین، از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) (TESCAN، مدل MIRA3، ساخت جمهوری چک) برای تشخیص مورفولوژی و اندازه پودر خشک SeNPs استفاده شده است. مزیت اصلی تجزیه و تحلیل FE-SEM نسبت به تجزیه و تحلیل SEM، قدرت تفکیک به مراتب بهتر آن به دلیل منبع تولید الکترون انتشار میدانی می باشد. از طرفی دستگاه FE-SEM مجهز به طیف سنج پراکندگی انرژی اشعه X (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) می باشد که به آن ضمیمه شده است و علاوه بر تصویربرداری از سطح نمونه، داده های مربوط به عناصر تشکیل دهنده نمونه نیز قابل استخراج می باشد. طیف سنج پراکندگی انرژی اشعه X (EDX) یکی از روش های تحلیلی است که برای تجزیه و تحلیل عناصر ساختاری نمونه ها استفاده می شود (۲۴).

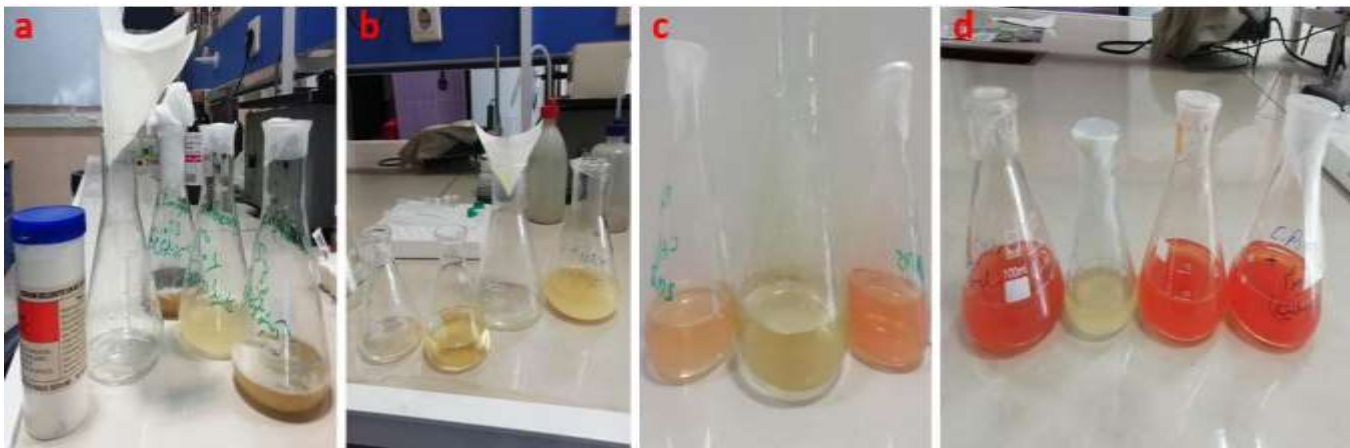
تعیین حساسیت ضدقارچی به کمک تست MIC انجام شد. حساسیت ضدقارچی با استفاده از روش مرجع توصیه شده توسط گایدلاین M38-A2 موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (Clinical & Laboratory Standards Institute) به صورت دو بار تکرار انجام شد (۲۵). چهار سویه استاندارد اسپرژیلوس مقاوم به دارو شامل A. fumigatus: TIMML-025، A. fumigatus: TIMML-026، A. flavus: TIMML-379 و A. flavus: TIMML-050 (تهیه شده توسط گروه قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران) بر روی پلیت های حاوی محیط سابورو دکستروز آگار Sabouraud (SDA) (مرک، آلمان) کشت داده شدند. سپس در شرایط استریل از کلنی های موردنظر به وسیله لوپ پلاستیکی یکبار مصرف، داخل ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع RPMI-1640 (سیگما آلد ریج، ایالات متحده آمریکا) تلقیح کرده و سوسپانسیون قارچی تهیه شد. در ادامه طبق دستورالعمل CLSI، میزان نور عبوری از سوسپانسیون ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر نور مرئی بین ۸۲-۸۰ درصد اندازه گیری شد که نشان دهنده وجود یک میلیون میکروارگانیسم در یک میلی لیتر محیط کشت بوده و باید هزار برابر رقیق شود. پودر دارویی خالص ایتراکونازول (Beers Janssen، بلژیک) و آمفوتریسین B (Bristol-Mers-Squib, Woerden، هلند) تهیه شد. پلیت های ۹۶ خانه با انجام رقت سازی سریالی به ترتیب ۴، ۳، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از عوامل ضدقارچی (شامل داروها و نانو ذرات) آماده گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون های قارچی با در نظر گرفتن کنترل منفی

SeNPs: TIMML-025 بیوسنتز شدند. به این صورت که این گونه استاندارد از قارچ اسپرژیلوس در محیط کشت مایع سابورو دکستروز برات ((Sabouraud dextrose broth (SDB)) (مرک، آلمان) به مدت ۴۸ ساعت روی شیکرانکوباتور و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد کشت داده شد. پس از این مدت، سوپرناتانت محیط کشت مایع که در حقیقت دارای انواع پروتئین های آلی و آنزیم های احیا کننده حاصل از رشد و متابولیسم میکروارگانیسم قارچی موردنظر می باشد، به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ از محیط کشت قارچ جدا شد. سپس ۱۰۰ میلی گرم سلنیت سدیم (Na_2SeO_3) در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به ۱۰۰ میلی لیتر از سوپرناتانت محیط کشت قارچ به منظور احیاء یون های سلنیوم، اضافه شد و در دمای ۲۸ سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت و ترجیحاً دور از نور انکوبه و شیک گردید. پس از این زمان یون های Se^{3+} تحت تاثیر پروتئین ها و آنزیم های محیط، احیاء شده و تولید نانو ذرات به صورت ماکروسکوپی با تغییر رنگ محیط از زرد به نارنجی مایل به قرمز قابل مشاهده بود (۲۲ و ۲۳). در حقیقت محلول قرمز رنگ کلئیدی حاوی نانو ذرات سلنیوم بوده که به صورت خارج سلولی بیوسنتز شده اند و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. قسمتی از محلول کلئیدی نیز توسط دستگاه فریز درایر در دمای ۷۶- درجه سانتی گراد و فشار ۰/۰۱ میلی بار خشک شده و تبدیل به پودر شد.

حضور SeNPs بیوسنتز شده توسط قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس و با استفاده از طیف سنجی UV-Vis در طول موج طیف نور فرابنفش - مرئی و محدوده ۸۰۰-۲۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV مدل Shimadzu ۲۵۵۰ (ژاپن) تأیید شد. دلیل استفاده از محدوده طول موج ۸۰۰-۲۵۰ نانومتر در این است که میزان جذب نور در طول موج های پایین تر از ۲۵۰ نانومتر زیاد بوده و پالس های اضافی مشاهده می شود. از طرفی شدت جذب نور در طول موج های بالاتر از ۸۰۰ نانومتر بسیار پایین بوده و نمودار موردنظر شبیه یک خط صاف خواهد بود. پس از آن با تشکیل یک قرص نازک برومید پتاسیم حاوی پودر خشک شده نانو ذرات و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Thermo Nicolet (USA) مدل AVATAR 370، طیف FT-IR موردنظر در ناحیه طیفی ۴۰۰۰-۴۰۰ cm^{-1} تهیه شد. علاوه بر این، پودر خشک SeNPs با استفاده از دستگاه پراش سنج اشعه ایکس (X-ray diffraction analysis) ساخت کشور ایتالیا (Model GNR Co.) (EXPLORER، مورد ارزیابی قرار گرفت که در حقیقت ساختار فاز کریستالی نانو ذرات بیوسنتز شده به وسیله تجزیه و تحلیل پراش اشعه ایکس (XRD) در ولتاژ ۴۰ کیلو ولت و با تابش Cu-Ka بررسی شد. سپس محلول کلئیدی کاملاً ورتکس شد تا محلول همگن و یکنواختی برای بررسی اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانو ذرات بیوسنتز

الگوی مقاومت این قارچها با اثر داروهای ضدقارچی تجاری مقایسه شد. در حقیقت از نانو ذرات بیوسنتز شده به وسیله میکروارگانیسم قارچی، علیه خود عوامل قارچی استفاده گردید. این نانو ذرات با محصولات متابولیکی و آنزیمها و پروتئینهای ترشچی در محیط کشت قارچ پوشانده شده‌اند و در صورت تیمار روی گونه‌هایی از همان خانواده، راحت‌تر به غشای سلولی قارچ متصل شده و وارد سلول می‌شوند (۲۷). بررسی این شرایط اجازه می‌دهد تا اثر بازدارندگی واقعی این نانو ذرات اندازه‌گیری شود.

(NC) و کنترل مثبت (PC) به همه چاهکها اضافه شد. در نهایت درب پلیت محکم بسته شد تا از تبخیر محتویات چاهکها جلوگیری شود و پلیت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه شد. مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) در مورد گونه‌های اسپریلوس، حداقل غلظت عوامل بازدارنده رشد در حقیقت غلظت چاهکی است که ۱۰۰ درصد عدم‌رشد قارچ را نشان داده است (۲۶). در اینجا از نانو ذرات سلنیوم بیوسنتز شده علیه سویه‌های استاندارد قارچهای رشته‌ای استفاده شد و



شکل ۱- مراحل بیوسنتز نانو ذرات سلنیوم به کمک قارچ اسپریلوس فومیگاتوس (a) کشت در محیط مایع، (b) جداسازی توده سلولی با کاغذ صافی و افزودن نمک سلنیوم به سوپرناتانت حاصل، (c و d) تغییر رنگ محلول کلئیدی واکنش پس از گذشت زمان (۱۲ تا ۴۸ ساعت)

پروتئین قارچی و نقش این پروتئینها به‌عنوان عوامل پایدارکننده‌ای که نانو ذرات را احاطه می‌کنند، هدف روش یاد شده است. بر اساس آنالیز FT-IR، طیف‌های حاصل، حضور گروه‌های کاربردی مختلف مانند باندهای O-H کششی، پیوندهای آمیدی، ارتعاشات کششی N-H، C-O و C-OH را نشان دادند (۳۰).

الگوی XRD حاصل از SeNPs مورد مطالعه تأیید کرد که این نانو ذرات تشکیل شده‌اند و ماهیت آرایش کریستالی آنها متمایز می‌باشد. زیرا که قارچ‌های رشته‌ای مانند *A. fumigatus* متابولیسم کاملی دارند (۳۱) و پروتئینها و آنزیمهای کاهنده قابل توجهی در محیط کشت مایع آزاد می‌کنند که برای کاهش هرچه بهتر و کامل‌تر یون‌های سلنیوم موجود در محیط ضروری می‌باشد (۳۲). در شکل ۴ شدت پراش اشعه X با زوایای 2θ و در محدوده 20° تا 80° مشاهده می‌شود. اندازه متوسط نانو ذرات با استفاده از معادله Debye-Scherrer $[D = 0.9\lambda / (\beta \cos \theta)]$ (۳۳) در حدود ۳۷ نانومتر بود.

میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) مورفولوژی SeNPs را نشان می‌دهد. وجود نانو ذرات سلنیوم با شکل تقریباً کروی و سایز تقریباً ۳۷ تا ۴۶ نانومتر، با مقیاس ۲۰۰ و ۵۰۰

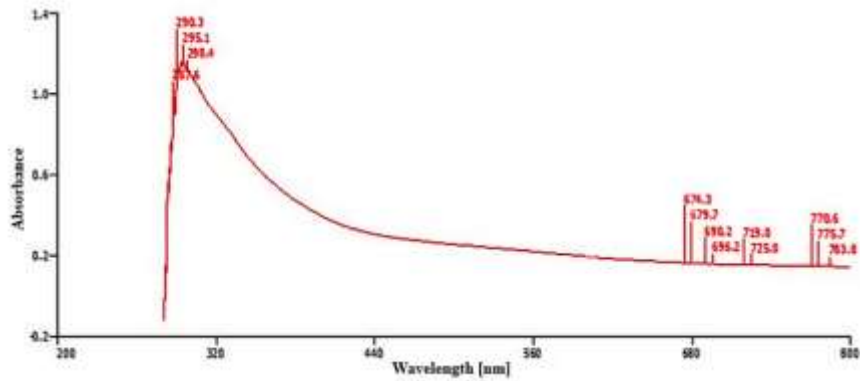
نتایج

با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis ثبت شده برای SeNPs در محدوده طول موج طیف نور فرابنفش - مرئی ۸۰۰-۲۵۰ نانومتر (با وضوح ۱ نانومتر)، کاهش زیستی یون‌های سلنیوم مورد ارزیابی قرار گرفت. در درجه اول سنتز خارج سلولی موفقیت‌آمیز نانو ذرات سلنیوم پس از افزودن Na_2SeO_3 با تغییر رنگ محلول کلئیدی به نارنجی مایل به قرمز نمایان شد. سپس حداکثر پلاسمون رزونانس سطحی (Surface plasmon resonance (SPR)) پیک SeNPs در ۲۹۵ نانومتر (λ_{max}) مشاهده شد (۲۸ و ۲۹).

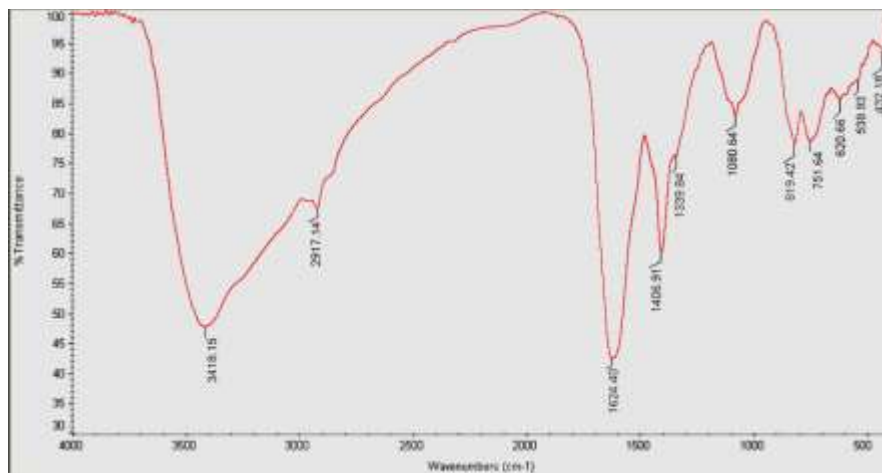
پایداری و پراکندگی مناسب نانو ذرات به برهم‌کنش آنها با پروتئین‌های قارچی نسبت داده می‌شود. به نظر می‌رسد عامل پوششی، پروتئین‌هایی باشند که سلول‌های قارچی ترشح کرده‌اند. طی فرآیند تولید نانو ذرات، پروتئین‌ها عامل پوششی را روی نانو ذرات تشکیل می‌دهند و با جلوگیری از تراکم ذرات موجب پایداری آنها می‌شوند. نمودار حاصل پس از سنتز نانو ذرات، ۵ پیک اصلی را در محدوده‌های ۱۶۲۴/۴۰، ۱۴۰۶/۹۱، ۱۰۸۰/۶۴، ۸۱۹/۴۲، ۳۴۱۸/۱۵ نشان می‌دهد. مشخص کردن برهم‌کنش نانو ذرات با

توجه به نمودار EDX ارایه شده، وجود عناصر اکسیژن (O)، سدیم (Na) و سلنیوم (Se) در ساختار نمونه سنتز شده تأیید شد.

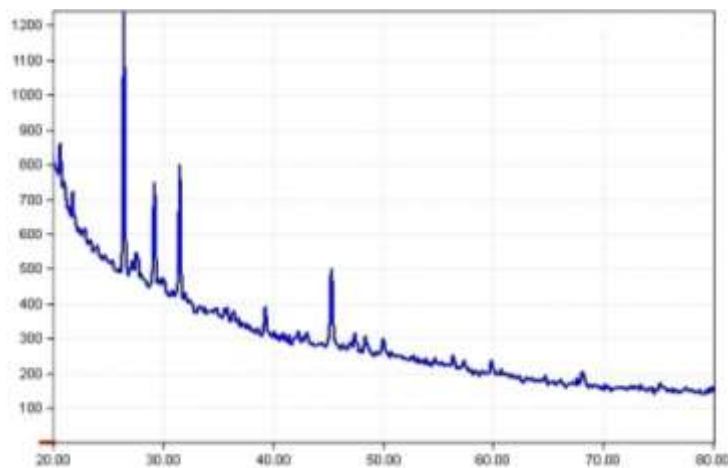
نانومتر و با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی اثبات شد. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی روبشی همچنین نشان داد که پودر مورد بررسی از نانو ذرات سلنیوم کمی آگلومره شده‌اند. همچنین با



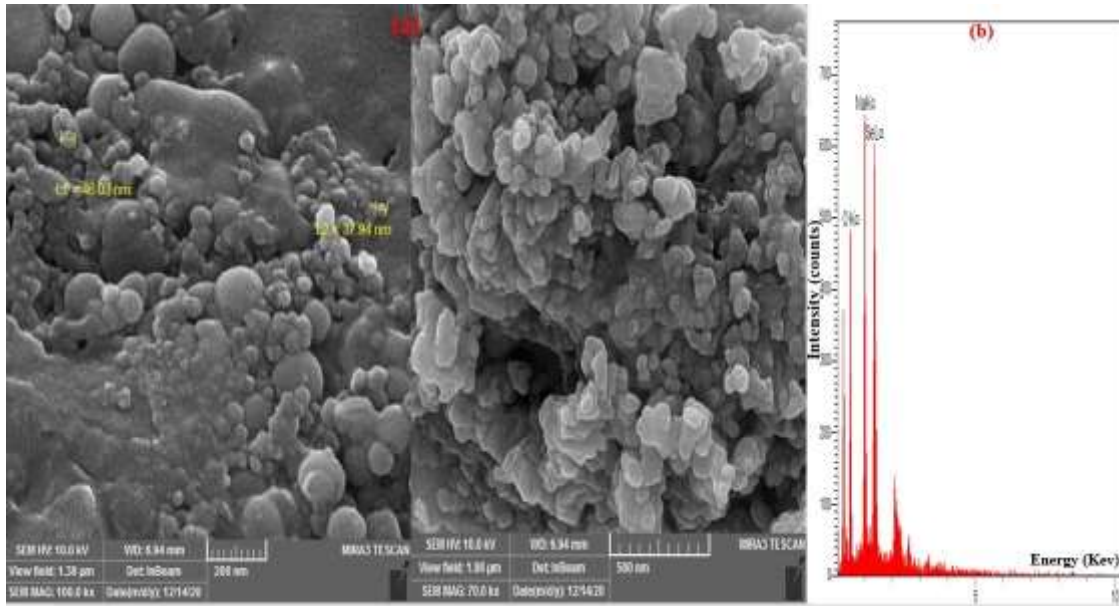
شکل ۲- طیف UV-Vis ثبت شده برای نانو ذرات سلنیوم به کمک میکروارگانیزم فارچی اسپرژیلوس فومیگاتوس



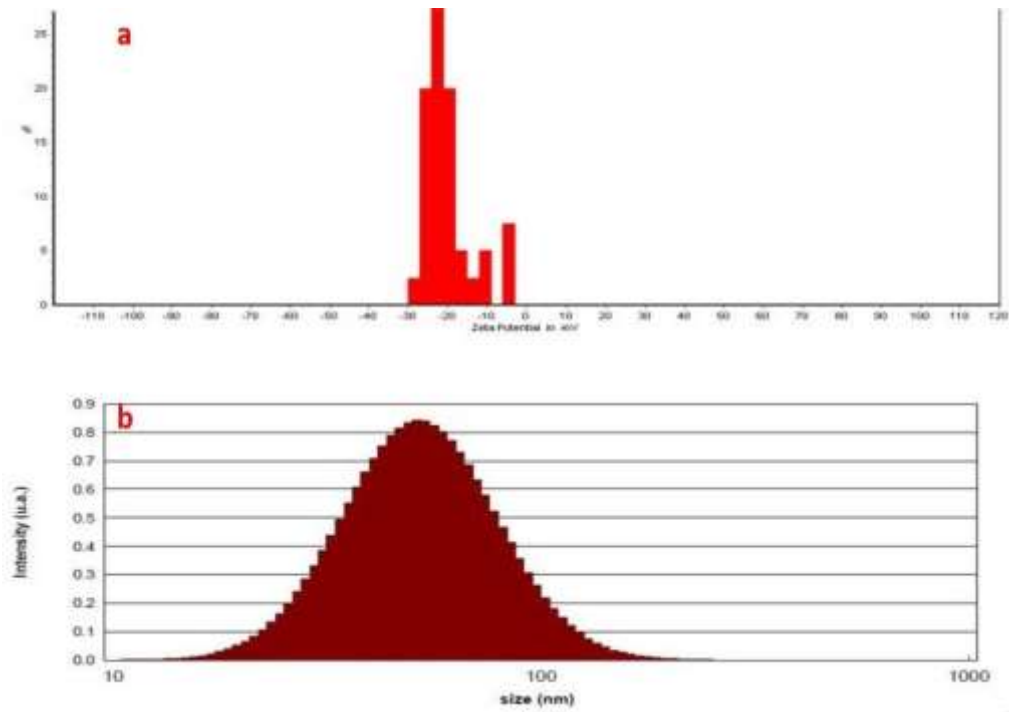
شکل ۳- طیف FT-IR ثبت شده از پودر نانو ذرات سلنیوم بیوستنز شده توسط فارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس



شکل ۴- نمودار طیف سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) حاصل از نانو ذرات سلنیوم سنتز شده به روش زیستی



شکل ۵- تأیید نانو ذرات سلنیوم به دست آمده به روش زیستی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و EDX (a) تصاویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM نانو ذرات سلنیوم (b) نمودار تأییدی EDX

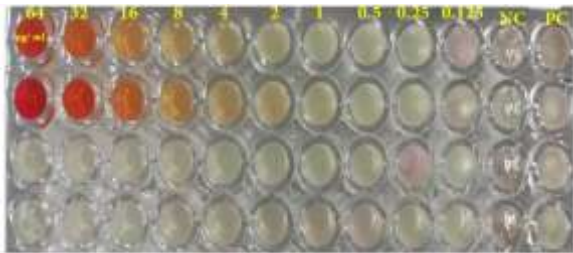


شکل ۶- (a) پتانسیل زتا و (b) اندازه نانو ذرات سلنیوم بیوسنتز شده با اسپرژیلوس فومیگاتوس

جدول ۱- نتایج MIC داروهای ایتراکونازول و آمفوتریسین B علیه سویه‌های استاندارد اسپرژیلوس

سویه‌های استاندارد قارچی	عوامل ضد قارچی	مقادیر MIC (µg/mL)
<i>A. fumigatus</i> : TIMML-025	Itraconazole	۸
<i>A. fumigatus</i> : TIMML-025	SeNPs	۱
<i>A. fumigatus</i> : TIMML-026	Itraconazole	۴
<i>A. fumigatus</i> : TIMML-026	SeNPs	۰/۵
<i>A. flavus</i> : TIMML-050	Amphotericin B	۸
<i>A. flavus</i> : TIMML-050	SeNPs	۱
<i>A. flavus</i> : TIMML-379	Amphotericin B	۴
<i>A. flavus</i> : TIMML-379	SeNPs	۰/۵

میکروگرم در میلی‌لیتر و حتی کمتر از آن کاهش یافت. نتایج MIC برای عوامل ضد قارچی با جزئیات در جدول ۱ مشخص شده است. همچنین تصویری از پلیت ۹۶ خانه‌ای از فعالیت ضد قارچی در شکل ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷- تصویر از پلیت جهت ارزیابی فعالیت ضد قارچی، شامل اثر SeNPs و داروهای ضد قارچی

بحث

با توجه به روند افزایشی سویه‌های قارچی مقاوم به دارو و همچنین افزایش استفاده از داروهای ضدقارچی برای درمان عفونت‌های مرتبط و عوارض جانبی متعدد این داروها، اهمیت روز افزون یافتن روشی جایگزین یا مکمل با خاصیت مهار این میکروارگانیسم‌ها نمایان می‌گردد (۳۶). بر این اساس توجه بیشتر به مطالعه سایر گزینه‌ها، از جمله استفاده از نانو ذرات زیستی، با کاربردهای گسترده و خواص منحصر به فرد، پیشنهاد می‌شود (۳۷). همان‌طور که وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه‌ای بیان کردند که به دلیل مقاومت‌های دارویی پیش‌بینی شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در آینده، درمان عفونت‌ها پیچیده خواهد بود و نانو ذرات می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنها باشند (۳۸). سنتزهای سبز یا زیستی به‌عنوان روش‌های جدید سنتز نانو ذرات با رویکردی ساده، زیست سازگار، بی‌خطر و اقتصادی می‌توانند جایگزین روش‌های شیمیایی و فیزیکی باشند و معایب تولید مواد سمی را ندارند (۳۰ و ۳۹). در تحقیقی که توسط Rafique و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد، نشان داده شده است که سنتز سبز نانو ذرات بیولوژیکی و کاربرد آنها به جای روش‌های

پس از قرار دادن محلول کلونیدی به مدت نیم ساعت در حمام اولتراسونیک (در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) میانگین پتانسیل زتا برای نانو ذرات سلنیوم بیوستنز شده با کمک *A. fumigatus*، ۲۱- میلی‌ولت در $pH=7/4$ و دمای ۲۲/۴ درجه سانتی‌گراد بوده که نشان می‌دهد نانو ذرات سلنیوم بیوستنز شده در محلول کلونیدی پایدار هستند. از آنجایی که بارهای مشابه دارای خاصیت دفع یکدیگر هستند، پایداری بالاتری برای نانو ذرات فراهم شده و از تجمع آنها جلوگیری می‌شود.

از سویی دیگر ارزیابی SeNPs‌های بیوستنز شده بر حسب توزیع اندازه ذرات متوسط در محلول کلونیدی در شکل ۶ نشان داده شده است. میانگین اندازه SeNPs بر اساس تجزیه و تحلیل DLS، بزرگتر از میزان به‌دست آمده توسط آنالیز XRD یا FE-SEM بود. این پدیده ممکن است به موادی نسبت داده شود که سطوح نانو ذرات را می‌پوشاند و آنها را تثبیت می‌کنند و با سنجش هیستوگرام به‌دست آمده از DLS تداخل ایجاد می‌کنند (۳۴). از طرفی در بررسی اندازه نانو ذرات به روش DLS چون از نمونه کلونیدی جهت شناسایی و تعیین اندازه استفاده می‌شود، تجمع اجتناب‌ناپذیر نانو ذرات با یکدیگر می‌تواند دلیل بر افزایش اندازه آنها باشد (۳۵). در نهایت وجود SeNPs‌های بیوستنز شده توسط *A. fumigatus* با میانگین اندازه تقریباً ۷۵ نانومتر توسط DLS اثبات شد.

نتایج به‌دست آمده از تست تعیین حساسیت، مهار رشد قارچ‌ها را در حضور غلظت‌های پایین‌تر نانو ذرات سلنیوم در مقایسه با داروهای ضد قارچی نشان داد. در اینجا از داروی ایتراکونازول به‌عنوان داروی هدف برای گونه‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس و از داروی آمفوتریسین B به‌عنوان داروی هدف برای گونه‌های اسپرژیلوس فلاووس استفاده شده است. مقادیر MIC برای داروهای ایتراکونازول و آمفوتریسین B علیه سویه‌های استاندارد قارچ‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس و اسپرژیلوس فلاووس به‌ترتیب ۸ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در حالی که مقادیر MIC برای نمونه‌های تیمار شده با SeNPs به ۱

نقره را در برابر اشرفیاکلی نشان دادند و تأکید شد که وقتی میکروارگانیسیم‌ها در معرض نانو ذرات نقره قرار می‌گیرند، تکثیر خود را از دست می‌دهند و پروتئین‌های سلولی آنها غیرفعال می‌شوند (۵۰). مهمترین مزیت مطالعه حاضر در این است که ما نانو ذرات سلنیوم را به کمک میکروارگانیسیم قارچی بیوسنتز کردیم و سپس آنها را بر علیه خود عوامل قارچی به‌کار گرفتیم. در یک تحقیق در سال ۲۰۱۷، لطفعلی و همکاران MIC های نانو ذرات سلنیوم را به تنهایی و در ترکیب با فلوکونازول (FLU)، ایتراکونازول (ITR) و آمفوتریسین B (AMB) بر روی سوبیه‌های مقاوم قارچ مخمری کاندیدا پاراپسیلوزیس (*Candida parapsilosis*) مورد بررسی قرار دادند (۵۱). در حالی که مطالعه حاضر، بر روی چندین سوبیه استاندارد قارچی مقاوم به دارو انجام شده است. در مطالعه‌ای دیگر که توسط وحدتی و همکاران در سال ۲۰۲۰ صورت گرفت، نشان داده شد که میزان MIC برای نانو ذرات تیمار شده بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و اشرفیاکلی (*Escherichia coli*) در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های معمولی کاهش یافته است (۵۲)، که این مفهوم با مطالعه حاضر مطابقت دارد. پس می‌توان گفت که این نانو ذرات می‌توانند به‌عنوان عامل بازدارنده رشد در میکروارگانیسیم‌های بیماری‌زای انسانی نقش داشته باشند (۵۳).

یکی از مهمترین مزیت‌های احتمالی استفاده از نانو ذرات به تنهایی، و یا استفاده همزمان از نانو ذره و دارو، تسهیل عبور نانو ذرات و داروها از غشای سلول قارچ از طریق تخریب غشا توسط نانو ذره می‌باشد که عامل کمک‌کننده در مهار عفونت‌های قارچی است (۵۳). همان‌طور که یاخچی و همکاران در تحقیقات اخیر خود در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که نانولیپونیوزوم حاوی عصاره گیاه با بر خورداری از ویژگی‌های مناسب فیزیکی و شیمیایی، افزایش پایداری دارو، کنترل خوب رهایش و سهولت عبور دارو از غشای سلول، می‌تواند یک عامل ضدقارچ امیدوارکننده با اثرات ضد قارچی بالا و عوارض جانبی کم باشد (۵۴). پیش از آن نیز هوانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ تسهیل عبور دارو به همراه نانو ذرات را با توجه اندازه آنها بررسی کردند و آنها هم مشاهدات یکسانی داشتند (۵۵). این اثرات از طریق انتقال راحت‌تر نانو ذرات بیوسنتز شده از منافذ غشای سلول و ورود به فضای داخل سلولی آنها و با مکانیسم غیرفعال کردن ژن‌های مقاومت دارویی میکروارگانیسیم‌ها و کاهش بیان ژن مورد نظر در مرحله رونویسی ژنوم می‌باشد (۵۶، ۵۷). حتی ممکن است این نانو ذرات بتوانند در مرحله ترجمه و پروتئین‌سازی سلول خلل ایجاد کنند و به حذف محصولات مضر، ناکارآمد و سمی سلول کمک کنند (۶۰-۵۸).

با توجه به استفاده روزافزون از داروهای ضدقارچی برای درمان بیماری‌های مربوطه، در آینده نزدیک شاهد مقاومت‌های دارویی

شیمیایی، یک روش سریع‌تر و ارزان‌تر از روش‌های شیمیایی است و خطرات کمتری برای انسان و محیط زیست دارد (۴۰). با توجه به اثرات ضدمیکروبی و ضدقارچی نانو ذرات زیستی سلنیوم، این نانو ذرات به‌عنوان عامل بالقوه‌ای برای بررسی‌های پیش رو در نظر گرفته می‌شوند (۴۱). سلنیوم یکی از عناصری است که اغلب به‌عنوان کاتالیزور در واکنش‌های کاهش اکسیداسیون استفاده می‌شود (۴۲) و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی (۴۳) و ضدمیکروبی است و در رشد و نمو سلول‌ها و تعادل سیستم ایمنی بدن انسان نقش دارد (۴۴). اهمیت این مطالعات زمانی واضح‌تر می‌شود که به اثربخشی مهباری نانو ذرات مذکور همراه با اثر مطلوب و غیرسایتوتوکسیک آنها در محیط *In vitro* پی می‌بریم؛ به‌طوری‌که طبق مطالعات پیشین، عوارض جانبی در استفاده از این نانو ذرات بیوسنتز شده برای انسان گزارش نشده است. ضیایی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تحقیق انجام شده بر روی اثر نانو ذرات سلنیوم بر سیستم‌های زیستی و اکولوژیکی نشان دادند که در حال حاضر مدرکی دال بر تأثیر منفی این نانو ذرات بر روی انسان وجود ندارد (۴۵).

در مطالعه حاضر نانو ذرات سلنیوم به روش زیستی به کمک یک سوبیه استاندارد قارچی و به‌صورت خارج سلولی بیوسنتز شدند. در اینجا تغییر رنگ محلول کلونیدی، از زرد به نارنجی تیره به‌عنوان اولین علامت بیوسنتز خارج سلولی نانو ذرات مشاهده شد و با چندین روش آزمایشگاهی دیگر، تشکیل و حضور نانو ذرات مورد تایید قرار گرفت و اثبات شد. در سایر مطالعات، از جمله مطالعه ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ و تحقیقات موسالام و همکاران در سال ۲۰۱۸، روش مشابهی برای سنتز نانو ذرات سلنیوم به کار گرفته شد (۴۶ و ۴۷). بر اساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه کنونی، قابلیت و توانایی نانو ذرات بیوسنتز شده در جلوگیری از رشد سوبیه‌های استاندارد قارچی و اثر مهباری مطلوب آنها بر روی رشد این میکروارگانیسیم‌ها در روش MIC مشاهده گردید. علاوه بر این، استفاده از نانو ذرات به تنهایی توانست منجر به جلوگیری از رشد عوامل قارچی در چند چاهک مورد نظر در پلیت ۹۶ خانه‌ای شود. طبق مقایسه نتایج، عملکرد این نانو ذرات نسبت به داروهای ضد قارچی به‌کار رفته مؤثرتر بود، به گونه‌ای که آنها حتی در غلظت‌های پایین‌تر نیز توانستند از رشد قارچ‌ها در چاهک جلوگیری کنند. محمودی و همکاران در مطالعه اخیر خود در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که نانو ذرات سلنیوم حتی در غلظت کمتر از داروهای ضد قارچی معمول، به میزان بیشتر و بهتری از رشد قارچ‌ها جلوگیری می‌کنند (۴۸). همچنین نقش و همکاران اثرات ضد قارچی نانو ذرات نقره را با داروی فلوکونازول بر اسپرژیلوس فومیگاتوس مقایسه کردند که نتایج آنها کاهش رشد قارچ را در حضور نانو ذرات مشخص می‌کرد (۴۹). سوندی و همکاران اثر ضد باکتریایی نانو ذرات

کارکنان آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی بیمارستان قائم (عج) دانشگاه علوم پزشکی مشهد تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Kalishwaralal K, Jeyabharathi S, Sundar K, Selvamani S, Prasanna M, Muthukumaran A. A novel biocompatible chitosan-Selenium nanoparticles (SeNPs) film with electrical conductivity for cardiac tissue engineering application. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;92:151-60. doi: 10.1016/j.msec.2018.06.036
2. Pourakbar L, Moghaddam SS, Popović-Djordjević J. Synthesis of metal/metal oxide nanoparticles by green methods and their applications. *Sustainable Agriculture Reviews* 41: Springer; 2020. p. 63-81. doi: 10.1007/s12210-021-01021-0
3. Hosseini Bafghi M, Safdari H, Nazari R, Darroudi M, Sabouri Z, Zargar M, et al. Evaluation and comparison of the effects of biosynthesized selenium and silver nanoparticles using plant extracts with antifungal drugs on the growth of *Aspergillus* and *Candida* species. *Rendiconti Lincei Rend Lincei Sci Fis Nat* 2021;32:791-803. doi: 10.1007/s12210-021-01021-0
4. Radhakrishnan R, Mani U, Gnanamani A, Shanmugavel M. Myco-Fabricated Gold Nanoparticles from *Aspergillus tamarii* MTCC5152, its Characterization and Dye Biodegradation. *Applied Microbiology: Theory & Technology* 2021:52-62. doi: 10.37256/amtt.222021792
5. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* 2019;12:908-31. doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011
6. Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *International Journal of Nanomedicine* 2018;13:2107. doi: 10.2147/IJN.S157541
7. Sood A, Salih S, Roh D, Lacharme-Lora L, Parry M, Hardiman B, et al. Signalling of DNA damage and cytokines across cell barriers exposed to nanoparticles depends on barrier thickness. *Nature Nanotechnology* 2011;6:824-33. doi: 10.1002/jat.3654
8. Flores-López LZ, Espinoza-Gómez H, Somanathan R. Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *Journal of Applied Toxicology* 2019;39:16-26.
9. Mittal AK, Kumar S, Banerjee UC. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *Journal of Colloid and Interface Science* 2014;431:194-9. doi: 10.1016/j.jcis.2014.06.030
10. Xu C, Qiao L, Ma L, Guo Y, Dou X, Yan S, et al. Biogenic selenium nanoparticles synthesized by *Lactobacillus casei* ATCC 393 alleviate intestinal epithelial barrier dysfunction caused by oxidative stress via Nrf2 signaling-mediated mitochondrial pathway. *International Journal of Nanomedicine* 2019;14:4491. doi: 10.2147/IJN.S199193
11. Shankar J, Tiwari S, Shishodia SK, Gangwar M, Hoda S, Thakur R, et al. Molecular insights into development and virulence determinants of *Aspergilli*: A proteomic perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018;8:180. doi: 10.3389/fcimb.2018.00180
12. Richardson M, Rautemaa-Richardson R. Exposure to *Aspergillus* in home and healthcare facilities' water environments: Focus on biofilms. *Microorganisms* 2019;7:7. doi: 10.3390/microorganisms7010007
13. Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, De Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJ, et al. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology* 2015;53:765-97. doi: 10.1093/mmy/myv067

نسبت به اکثر گونه‌های قارچی بیماری‌زا خواهیم بود که این معضل در مورد سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نیز مطرح خواهد بود و باعث می‌شود که مطالعه بر روی نانو ذرات و کاربرد و ویژگی‌های گسترده آنها بیشتر مورد توجه قرار گیرد (۶۱). بر اساس گزارشات اخیر لیو و همکاران در سال ۲۰۲۱، تأثیر نانو ذرات بی‌خطر زیستی بر روی سلول‌ها می‌تواند منجر به تقویت سیستم ایمنی میزبان شود (۶۲). همچنین طی تحقیقاتی که توسط مینیزس و همکاران نشان داده شده است، استفاده از نانو ذرات در زنان باردار می‌تواند خطرات مصرف داروهای مختلف در دوران بارداری را با اتکا به مکانیسم‌های انتقال دارو کاهش دهد (۶۳). از سوی دیگر نانو ذرات تولید شده به روش زیستی می‌توانند به‌عنوان عوامل ضدسرطانی در سیستم‌های کنترل سرطان نیز مؤثر باشند (۶۴). همان‌طور که داورو همکاران در مطالعه بر روی مقاومت به شیمی‌درمانی در بیماران سرطانی به این نتیجه رسیدند که شیمی‌درمانی که مؤثرترین روش درمان سرطان است، در آینده با مقاومت دارویی مواجه خواهد شد (۶۵). از این رو بکارگیری سیستم نانو ذرات می‌تواند روش تازه و مؤثری برای کنترل آپوپتوز و مسیرهای سیگنالینگ در درمان بیماران سرطانی باشد (۶۶). در این زمینه وارونکومار و همکاران در مطالعات تازه‌ای در سال ۲۰۲۰، اثر نانو ذرات نقره را در درمان سرطان ریه با مکانیسم کنترل آپوپتوز در رده سلولی بررسی کردند که نتایج امیدوارکننده‌ای به‌دست آمد (۶۷). در تحقیقی دیگر یالاپو و همکاران فعالیت ضدسرطانی نانو ذرات کورکومین را در سرطان پروستات بررسی کردند و اثر مطلوب آن را گزارش نمودند (۶۸). همچنین در مطالعه اخیر توسط سبتتاراسو و همکاران در سال ۲۰۲۱، تأثیر SeNPs بیولوژیکی بر سلول‌های سرطانی پستان با فعالیت ضدتکثیر سلول‌های سرطانی و با مکانیسم احتمالی ایجاد آپوپتوز پیشنهاد شده است (۶۹).

می‌توان نتیجه گرفت که با استناد به تحقیقات گذشته و همچنین نتایج مثبت به‌دست آمده از مطالعه حاضر، نانو ذرات بیوسنتز شده به روش‌های زیستی دارای اثر بهتر و کارایی مناسب‌تری در مقایسه با نانو ذرات شیمیایی (تجاری) هستند و می‌توانند در آینده با تحقیقات کامل‌تر و گسترده‌تر کمک شایانی به حوزه‌های مختلف پزشکی نمایند. این نانو ذرات به‌عنوان مکمل و یا حتی جایگزین خوبی برای حل مشکلات و معضلات مقاومت‌های دارویی پیش‌رو در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله مقاومت به داروهای ضد قارچی، مطرح هستند. از طرفی کاربرد این نانو ذرات بدون عوارض جانبی ناخواسته می‌باشد و در دنیای امروز کاملاً مقرون به صرفه و اقتصادی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تشکر می‌کنیم. همچنین از همکاری

14. Kousha M, Tadi R, Soubani A. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review* 2011;20:156-74. doi: 10.1183/09059180.00001011
15. Amini F, Mirhendi H, Kachuei R, Noorbakhsh F. Detection and Identification of *Aspergillus fumigatus* in BAL Samples of Patients with Suspected Tuberculosis by Nested-PCR. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2014;8:14-21.
16. Jenkins DR. Nosocomial infections and infection control. *Medicine* 2017;45:629-33. doi: 10.1016/j.mpmed.2017.07.005
17. Diba K, Makhdoomi K, Rahimirad M, Jabari D. Survey of opportunistic fungi in the clinical and environmental specimens obtained from Urmia educational hospitals. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences* 2014;6:51-8.
18. Lakhani P, Patil A, Majumdar S. Challenges in the polyene-and azole-based pharmacotherapy of ocular fungal infections. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2019;35:6-22. doi: 10.1089/jop.2018.0089
19. Martínez-Esquivias F, Guzmán-Flores JM, Pérez-Larios A, González Silva N, Becerra-Ruiz JS. A Review of the Antimicrobial Activity of Selenium Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2021;21:5383-98. doi: 10.1166/jnn.2021.19471
20. Bafghi MH, Darroudi M, Zargar M, Zarrinfar H, Nazari R. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Aspergillus flavus* and *Candida albicans* for antifungal applications. *Micro & Nano Letters* 2021. doi: 10.1049/mna2.12096
21. Nayak V, Singh KR, Singh AK, Singh RP. Potentialities of selenium nanoparticles in biomedical science. *New Journal of Chemistry* 2021;45:2849-78. doi: 10.1039/D0NJ05884J
22. Srivastava N, Mukhopadhyay M. Green synthesis and structural characterization of selenium nanoparticles and assessment of their antimicrobial property. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2015;38:1723-30.
23. Bafghi MH, Nazari R, Darroudi M, Zargar M, Zarrinfar H. The effect of biosynthesized selenium nanoparticles on the expression of CYP51A and HSP90 antifungal resistance genes in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Biotechnol Prog* 2021:e3206. doi: 10.1002/btpr.3206
24. Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry: EJH* 2018;62. doi: 10.4081/ejh.2018.2841
25. Koehler A, Corbellini VA, Heidrich D, Scroferneker ML. Prediction of itraconazole minimum inhibitory concentration for *Fonsecaea pedrosoi* using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and chemometrics. *Plos One* 2020;15:e0243231.
26. Siopi M, Pournaras S, Meletiadi J. Comparative evaluation of Sensititre YeastOne and CLSI M38-A2 reference method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* spp. against echinocandins. *Journal of Clinical Microbiology* 2017;55:1714-9. doi: 10.1128/jcm.00044-17
27. Zomorodian K, Pourshahid S, Sadatsharifi A, Mehryar P, Pakshir K, Rahimi MJ, et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. *BioMed Research International* 2016;2016. doi: 10.1155/2016/5435397
28. Delgado-Beleño Y, Martínez-Núñez C, Cortez-Valadez M, Flores-López N, Flores-Acosta M. Optical properties of silver, silver sulfide and silver selenide nanoparticles and antibacterial applications. *Materials Research Bulletin* 2018;99:385-92. doi: 10.1016/j.materresbull.2017.11.015
29. Srivastava N, Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles using *Gliocladium roseum*. *Journal of Cluster Science* 2015;26:1473-82.
30. Pantidos N, Horsfall LE. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 2014;5:1. doi: 10.4172/2157-7439.1000233
31. Drott MT, Rush TA, Satterlee TR, Giannone RJ, Abraham PE, Greco C, et al. Microevolution in the pansecondary metabolome of *Aspergillus flavus* and its potential macroevolutionary implications for filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2021;118. doi: 10.1073/pnas.2021683118
32. Troiano D, Orsat V, Dumont M. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2020;117:109472. doi: 10.1016/j.rser.2019.109472
33. Hosseini Bafghi M, Zarrinfar H, Darroudi M, Zargar M, Nazari R. Green synthesis of selenium nanoparticles and evaluate their effect on the expression of ERG3, ERG11 and FKS1 antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Letters in Applied Microbiology* 2022;74:809-19. doi: 10.1111/lam.13667
34. Soliman AM, Abdel-Latif W, Shehata IH, Fouda A, Abdo AM, Ahmed YM. Green approach to overcome the resistance pattern of *Candida* spp. using biosynthesized silver nanoparticles fabricated by *Penicillium chrysogenum* F9. *Biological Trace Element Research* 2021;199:800-11.
35. Kazemi M, Akbari A, Sabouri Z, Soleimanpour S, Zarrinfar H, Khatami M, et al. Green synthesis of colloidal selenium nanoparticles in starch solutions and investigation of their photocatalytic, antimicrobial, and cytotoxicity effects. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2021;44:1215-25.
36. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e383-92. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X
37. Abdelghany T, Al-Rajhi AM, Al Abboud MA, Alawlaqi M, Magdah AG, Helmy EA, et al. Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: about future directions. A review. *BioNanoScience* 2018;8:5-16.
38. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* 2017;12:1227. doi: 10.2147%2FIJN.S121956
39. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000;52:662-8. doi: 10.1002/1097-4636(20001215)52:4<3C662::AIDJBM10%3E3.0.CO;2-3
40. Rafique M, Sadaf I, Rafique MS, Tahir MB. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2017;45:1272-91. doi: 10.1080/21691401.2016.1241792
41. Rasouli M. Biosynthesis of selenium nanoparticles using yeast *Nematosporea coryli* and examination of their anti-candida and anti-oxidant activities. *IET Nanobiotechnol* 2019;13:214-8. doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5187
42. Delacôte C, Bonakdarpour A, Johnston CM, Zelenay P, Wiecekowski A. Aqueous-based synthesis of ruthenium-selenium catalyst for oxygen reduction reaction. *Faraday Discussions* 2009;140:269-81. doi: 10.1039/B806377J
43. Jackson MI, Combs GF. Selenium as a cancer preventive agent. *Selenium: Springer*; 2011. p.313-23. doi: 10.1007/978-1-4614-1025-6_24
44. Rayman MP. Selenium and human health. *The Lancet* 2012;379:1256-68. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61452-9
45. Ziyaei N. Study the toxicological effect of nanosilver particle on biological and ecological systems. *Agricultural Biotechnology Journal* 2014;6:121-48.

46. Zhang H, Zhou H, Bai J, Li Y, Yang J, Ma Q, et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles mediated by fungus *Mariannaea* sp. HJ and their characterization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2019;571:9-16. doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.02.070
47. Mosallam FM, El-Sayyad GS, Fathy RM, El-Batal AI. Biomolecules-mediated synthesis of selenium nanoparticles using *Aspergillus oryzae* fermented Lupin extract and gamma radiation for hindering the growth of some multidrug-resistant bacteria and pathogenic fungi. *Microbial Pathogenesis* 2018;122:108-16. doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.013
48. Mahmoudi S, Vahidi M, Malekabad ES, Izadi A, Khatami M, Dadashi A. In vitro antifungal activity of green synthesized silver nanoparticles in comparison to conventional antifungal drugs against *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum*. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*. 2021;21:370-4. doi: https://doi.org/10.2174/1871526520666200715095744
49. Naghsh N, Douidi M, Safaiejad Z. The Antifungal Activity of Silver Nanoparticles and Fluconazole on *Aspergillus Fumigatus*. *Medical Laboratory Journal* 2013;7:7-12.
50. SonDI I, Salopek-SonDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004;275:177-82. doi: https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012
51. Lotfali E, Shahverdi AR, Mohammadi R, Noorbakhsh F, Ghajari A, Ansari S, et al. In Vitro Activity of Two Nanoparticles on Clinical Isolates of *Candida parapsilosis*, Showing Resistance Against Antifungal Agents in Children. *Arch Clin Infect Dis* 2017;12. doi: %2010.5812/archcid.13853
52. Vahdati M, Moghadam TT. Synthesis and characterization of selenium nanoparticles-lysozyme nanohybrid system with synergistic antibacterial properties. *Scientific Reports* 2020;10:1-10.
53. Lee N-Y, Ko W-C, Hsueh P-R. Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. *Frontiers in Pharmacology* 2019;10:1153. doi: 10.3389/fphar.2019.01153
54. Yakhchi V, Jahanizadeh S, Yazdian F, Rashedi H, Haghirsadat BF. Synthesis and Evaluation of Lipid-based Nanoparticle Containing Ginger Extract against *Aspergillus* Species. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2020. doi: 10.18502/ssu.v28i6.4155
55. Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu C-M, Huang C-M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry* 2010;17:585-94. doi: 10.2174/092986710790416290
56. Lara HH, Guisbiers G, Mendoza J, Mimun LC, Vincent BA, Lopez-Ribot JL, et al. Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Nanomedicine* 2018;13:2697. doi: 10.2147%2FIJN.S151285
57. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013;65:1803-15. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.011
58. Sindhwani S, Chan WC. Nanotechnology for modern medicine: next step towards clinical translation. *Journal of Internal Medicine* 2021. doi: 10.1111/joim.13254
59. Tamiyakul H, Roytrakul S, Jaresithikunchai J, Phaonakrop N, Tanasupawat S, Warisnoicharoen W. Changes in protein patterns of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by silver nanoparticles capped with poly (4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid) polymer. *Asian Biomed* 2019;13:39-47. doi: 10.1515/abm-2019-0039
60. Cui D, Zhang H, Wang K, Gao F, Zhang X, Asahi T, et al. Gold Nanoparticles Enhance Efficiency of In Vitro Gene Transcription-Translation System. *Nano Biomedicine & Engineering* 2011;3. doi: 10.5101/nbe.v3i2.p120-125
61. Firooz A, Daneshpazhooh M, Lotfali E, Sharzad Kavkani M, Ghasemi Z, Khamesipour A, et al. Drug Sensitivity Profile of Fungi Isolated from Onychomycosis Patients and Evaluation of Squalene Epoxidase Mutation in One Terbinafine-Resistant *Trichophyton mentagrophytes* Species. *Microbial Drug Resistance* 2021. doi: 10.1089/mdr.2020.0572
62. Liu Q, Duo Y, Fu J, Qiu M, Sun Z, Adah D, et al. Nano-immunotherapy: Unique mechanisms of nanomaterials in synergizing cancer immunotherapy. *Nano Today* 2021;36:101023. doi: 10.1016/j.nantod.2020.101023
63. Menezes V, Malek A, Keelan J. Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2011;12:731-42.
64. Vemuri SK, Banala RR, Mukherjee S, Uppala P, Subbaiah G, AV GR, et al. Novel biosynthesized gold nanoparticles as anti-cancer agents against breast cancer: Synthesis, biological evaluation, molecular modelling studies. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;99:417-29. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.123
65. Dawar S, Singh N, Kanwar RK, Kennedy RL, Veedu RN, Zhou S-F, et al. Multifunctional and multitargeted nanoparticles for drug delivery to overcome barriers of drug resistance in human cancers. *Drug Discovery Today* 2013;18:1292-300. doi: 10.1016/j.drudis.2013.09.009
66. Zou J, Zhu B, Li Y. Functionalization of silver nanoparticles loaded with paclitaxel-induced A549 cells apoptosis through ROS-mediated signaling pathways. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2020;20:89-98. doi: 10.2174/1568026619666191019102219
67. Varunkumar K, Anusha C, Saranya T, Ramalingam V, Raja S, Ravikumar V. *Avicennia marina* engineered nanoparticles induce apoptosis in adenocarcinoma lung cancer cell line through p53 mediated signaling pathways. *Process Biochemistry* 2020;94:349-58. doi: 10.1016/j.procbio.2020.04.034
68. Yallapu MM, Khan S, Maher DM, Ebeling MC, Sundram V, Chauhan N, et al. Anti-cancer activity of curcumin loaded nanoparticles in prostate cancer. *Biomaterials* 2014;35:8635-48. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.040
69. Cittrarasu V, Kaliannan D, Dharman K, Maluven V, Easwaran M, Liu WC, et al. Green synthesis of selenium nanoparticles mediated from *Ceropegia bulbosa* Roxb extract and its cytotoxicity, antimicrobial, mosquitocidal and photocatalytic activities. *Scientific Reports* 2021;11:1-15.



Enhancing the Antifungal Effect of Biosynthesized Selenium Nanoparticles Using *Aspergillus Fumigatus*

Hamid Sadeghian (Ph.D.)¹, Hossein Zarrinfar (Ph.D.)², Hadi Safdari (M.Sc.)¹, Mohammad Hossein Ahmadi (Ph.D.)¹, Maedeh Tahan (B.Sc.)¹, Mahdi Hosseini Bafghi (Ph.D.)^{1*}

1- Dept. of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

2- Dept. of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received: 6 February 2022, Accepted: 18 June 2022

Abstract:

Introduction: Green synthesis as a new method of synthesis of nanoparticles with a simple, biocompatible, safe, and economical approach can be an alternative to chemical and physical processes. Fungi can convert some toxic ions into less harmful forms, including nanoparticles. Nanoparticles with a size of 1 to 100 nanometers have unique quantum properties. Today, the problems of drug resistance have been seen in different species of fungi. Selenium nanoparticles (SeNPs) are substances that have been reported to have antifungal properties. The present study aimed to investigate the antifungal effect of biosynthesized SeNPs using *Aspergillus fumigatus*.

Methods: For this purpose, SeNPs were biosynthesized with a specific concentration using *A. fumigatus*. The presence of nanoparticles was confirmed by various methods, including UV-Vis, FT-IR, FE-SEM, EDX, XRD, DLS, and Zeta potential. Then, susceptibility determination based on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test was performed on standard fungal strains treated with SeNPs.

Results: After confirming the results of nanoparticle biosynthesis, the MICs for Itraconazole and Amphotericin B against the standard fungal strains were 8 and 4 µg/mL respectively. In comparison, MIC values for SeNPs-treated samples were reduced to 1 µg/mL and below.

Conclusion: Due to the increasing resistance of opportunistic fungi to target antifungal drugs, the use of biosafety SeNPs even at low concentrations can have favorable inhibitory effects on the growth of fungal pathogens.

Keywords: Green synthesis, Selenium nanoparticles, *Aspergillus*, Drug resistance, MIC.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Hosseini Bafghi, Email: M_hosseini79@yahoo.com

Citation: Hamid Sadeghian, Hossein Zarrinfar, Hadi Safdari, Mohammad Hossein Ahmadi, Maedeh Tahan, Mahdi Hosseini Bafghi. Enhancing the antifungal effect of biosynthesized selenium nanoparticles using *Aspergillus fumigatus*. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2022;17(3):40-51.