بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم فرنوش حقیقی رشته قارچ شناسی پزشکی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان: ارزیابی مقایسه ایی فعالیت مهاری بیوسایدهای EDTA و نانوذره Tio2 بر روی تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس در تاریخ ۸۹/۱۱/۴ ارائه کردند

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر شهلا رودبار محمدی	(استاد راهنما)	
دکتر پریسا محمدی	(استاد مشاور)	
دکتر زهره فرح نژاد	(استاد ناظر)	دکتر زهره فرح نژاد ۸۹/۱۱/۴
دکتر محمدحسین یادگاری	(استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه(اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئیننامههای مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فرنوش حقیقی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۸۷** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا
تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:
ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **قارچ شناسی پزشکی** است که در سال **۸۷** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی خانم **دکتر شهلا رودبار محمّدی** ، مشاوره خانم **دکتر پریسا محمّدی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **فرنوش حقیقی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی مقایسه ایی فعالیت مهاری بیوسایدهای EDTA و نانوذره TiO2 بر روی تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس*

نگارش

فرنوش حقیقی

استاد راهنما

دکتر شهلا رودبار محمّدی

استاد مشاور

دکتر پریسا محمّدی

زمستان ۱۳۸۹

تقدیم به پدر و مادر مهربان و بزرگوارم

که با زحمات بی شائبه و الطاف بی دریغشان مرا به سوی موفقیت رهنمون نمودند

تقدیم به برادر عزیزم

که همواره در تمامی مراحل دشوار پشتیبان من بوده است

تشکر و قدردانی

نخست پروردگار متعال را سپاس می گویم که توفیق انجام این تحقیق را بر من عنایت فرمود.

سپس به حکم وظیفه و ادب بر خود می دانم از بزرگوارانی که در تمامی مراحل تحقیق مرا یاری رسانیدند تشکر کنم.

تشکر ویژه و قدردانی خود را از استاد عزیز و گرامیام خانم دکتر شهلا رودبار محمّدی ابراز می نمایم که با لطف بی پایانشان راهنمائی این پایان نامه را بر عهده داشتند.

از خانم دکتر پریسا محمّدی که در مشاوره و اجرای مراحل مختلف پایان نامه با صبر و بردباری مرا از تجربیات ارزشمندشان بهرمند نمودند نهایت تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر یادگاری و سر کار خانم دکتر فرح نژاد که داوری این پایان نامه را قبول زحمت فرمودند کمال تشکر را دارم.

از سر کار خانم دکتر شمس که همواره از راهنمائی های ارزشمندشان بهره بردم کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از زحمات و همکاری های بی دریغ سرکار خانم رازقی کارشناس محترم گروه قارچ شناسی پزشکی کمال سپاس و تشکر را دارم.

از راهنمائی های ارزشمند آقای مهندس اسکندری کمال تشکر را دارم.

از دوستان خوبم خانم ها سعادت، رودباری، امانی، حسینی، طیفوری، جهانشیری، نصراللّهی و آقایان فرح بخش، تقی زاده، رنجبریان به خاطر راهنمائی های بی دریغشان تقدیر و تشکر نموده و از خداوند متعال برای تمامی این عزیزان آرزوی موفقیت می نمایم.

چکیده

کاندیدا آلبیکنس چهارمین عامل مهم عفونتهای مزمن قارچی است که مخاط را درگیر نموده و ایجاد عفونت در بافتهای عمقی مینماید. امروزه مرگومیر ناشی از عفونتهای بیوفیلم کاندیدایی در پی استفاده از ابزارهای پزشکی مانند کاتترها و ایمپلنتها رو به افزایش است لذا یافتن روشهای نوین مبارزه با عوامل چنین عفونتهای قارچی ضروری بنظر میرسد. از اینرو در این مطالعه تلاش شد تا خصوصیات نانوذرات TiO۲، TiO۲ فتوکاتالیست و EDTA بر روی مهار رشد و بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* ارزیابی گردد. برای این منظور ابتدا نانوذرات TiO۲ با پیش ساز TiCl۴ سنتز شد. اندازه و نوع ذرات بترتیب بوسیله SEM و XRD تعیین شد. نانوذره سنتز شده در معرض پرتو فرابنفش با طولموج ۳۷۰ نانومتر قرار گرفت. خاصیت ضد قارچی عوامل با استفاده از روش های حداقل غلظت مهاری و نیز با تشکیل بیوفیلم و ارزیابی آن به پنج روش وزن خشک، MTT، XTT، SEM و ATPase سنجیده شد. سپس قطعاتی از جنس شیشه، PVC و کاتتر باTiO۲ پوشش داده شد و میزان تشکیل بیوفیلم بر روی آنها ارزیابی گردید.

یافته ها نشان داد که TiO۲، TiO۲ فتوکاتالیست و EDTA دارای حداقل غلظت مهارکنندگی در غلظت های ۳/۵۱، ۲/۷۴ و۲/۴۸ میکروگرم در میلیلیتر برای سویه حساس و ۴/۰۶، ۳/۱ و ۴/۶۵ میکروگرم در میلیلیتر برای سویه مقاوم می باشند. خاصیت مهارکنندگی تشکیل بیوفیلم در حضور نانوذره TiO۲ و EDTA با دو روش XTT، MTT برای سویه حساس به ترتیب ۵/۱۴ و ۸/۰۹ میکروگرم در میلیلیتر و برای سویه مقاوم ۵/۳۵ و ۱۱/۳۳ میکروگرم در میلیلیتر بود که این اثر با روش ATPase نیز تایید شد.

در مطالعه حاضر نانوذره TiO۲ و EDTA اثر مطلوبی در حذف بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. استفاده از نانوذرات و مواد مذکور میتواند بعنوان راهکاری جدید جهت پیشگیری از تشکیل بیوفیلم قارچی به ویژه بیوفیلمهای مرتبط با ابزارهای پزشکی مورد توجه قرار گیرد که البته تحقیقات بیشتری را در جهت بهینه نمودن شرایط استفاده از این ترکیبات می طلبد.

کلمات کلیدی: بیوفیلمهای قارچی، *کاندیدا آلبیکنس*، نانوذرات TiO2، EDTA، ATPase، SEM.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. ساختار بیوفیلم ۳

۱-۲. تشکیل بیوفیلم ۴

۱-۳. مراحل تشکیل بیوفیلم ۶

۱-۳-۱. اتصال به سطح (Attachment) ۶

۱-۳-۲. تشکیل میکروکلنی (Microcolony formation) ۷

۱-۳-۳. بلوغ (Maturation) ۷

۱-۳-۴. جداشدن (Detachment) ۸

۱-۴. عوامل موثر بر تشکیل بیوفیلم *کاندیدایی* ۹

۱-۴-۱. ویژگی های سطح سلول ۹

۱-۴-۲. ویژگی های سطح تماس ۹

۱-۴-۲-۱. ماهیت شیمیایی سطوح ۹

۱-۴-۲-۲. دسترسی سطوح به رطوبت ۱۰

۱-۴-۲-۳. توپوگرافی سطوح ۱۰

۱-۴-۲-۴. مدت زمان اتصال ۱۰

۱-۴-۲-۵. آماده سازی و فعال سازی سطوح ۱۰

۱-۴-۳. عوامل محیطی ۱۰

۱-۴-۴. شکل های مختلف *کاندیدا آلبیکنس* ۱۱

۱-۵. بلوغ بیوفیلم ۱۱

۱-۵-۱. سیستم QS ۱۱

۱-۶. روش های مطالعه بیوفیلم ۱۴

۱-۶-۱. روش های کیفی ۱۴

۱-۶-۱-۱. استفاده از میکروسکوپ ها ۱۴
۱-۶-۱-۲. تست لوله (Tube Test) ۱۴
۱-۶-۱-۳. پلیت میکروتیتر ۱۵
۱-۶-۲. روش های کمی ۱۵
۱-۶-۲-۱. اندازه گیری جرم بیوفیلم ۱۵
۱-۶-۲-۲. تعیین شمارش کلنی در واحد سطح (CFU) ۱۵
۱-۶-۲-۳. روش های مولکولی ۱۶
۱-۷. مکانیسم های معمول مقاومت بیوفیلم به عوامل ضد میکروبی ۱۶
۱-۸. کنترل بیوفیلم ۱۷
۱-۸-۱. استفاده از سیستم QS برای درمان بیوفیلم ۱۷
۱-۸-۲. درمان فیزیکی و شیمیایی برای بیوفیلم ۱۷
۱-۸-۳- درمان ترکیبی ۱۸
۱-۸-۴. استفاده از ترکیبات ضد میکروبی جدید ۱۸
۱-۸-۴-۱. مهارکننده های طبیعی ۱۸
۱-۸-۴-۲. مهارکننده های شیمیایی ۱۹
۱-۸-۴-۲-۱. دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) ۲۰
۱-۸-۴-۲-۲. اتیلندیآمینتتراستیکاسید (EDTA) ۲۰
۱-۸-۴-۲-۳. فرمالدئید ۲۲
۱-۸-۴-۲-۴. گلوتارآلدئید ۲۲
۱-۸-۴-۲-۵. هالوژن ها (ترکیبات یده یا هیپوکلریت) ۲۳
۱-۸-۴-۲-۶. پراکسید هیدروژن ۲۳
۱-۹. راهکاری دیگر برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم ۲۴

۱-۱۰. مروری بر مطالعات گذشته..... ۲۵
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۱
۲-۱. تهیه سوش های قارچی استاندارد..... ۳۲
۲-۲. آزمایش های تائیدی جهت تشخیص سویه های حساس و مقاوم به فلوکونازول*کاندیدا آلبیکنس*..... ۳۲
۲-۲-۱. بررسی مستقیم میکروسکوپی..... ۳۲
۲-۲-۲. آزمایش تولید لوله زایا..... ۳۲
۲-۲-۳. آزمایش ایجاد کلامیدوسپور..... ۳۳
۲-۳. تهیه سوسپانسیون قارچی..... ۳۳
۲-۴. تعیین و تائید حساسیت سوش ها نسبت به فلوکونازول‌ها استفاده از روش دیسک دیفیوژن..... ۳۴
۲-۵. تهیه نانوذره TiO_2 از طریق روش سل- ژل..... ۳۵
۲-۵-۱. تهیه شکل فتوکاتالیستی نانوذره TiO_2..... ۳۶
۲-۶. بررسی نانوذره TiO_2 با پراش اشعه ایکس(XRD)..... ۳۶
۲-۷- بررسی نانوذره TiO_2 با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۳۷
۲-۷-۱. آماده سازی نمونه ها جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره ۳۷
۲-۸. رقت سازی..... ۳۷
۲-۸-۱. تهیه رقت از نانوذره TiO_2..... ۳۷
۲-۸-۲. تهیه رقت از بیوساید EDTA..... ۳۸
۲-۸-۳. تهیه رقت از فلوکونازول..... ۳۸
۲-۹. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد..... ۳۹
۲-۹-۱. تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی‌نانوذره TiO_2، بیوساید EDTA و فلوکونازول برروی سویه های *کاندیدا آلبیکنس* از طریق تست رقت سازی وشمارش تعداد کلنی هاCFU..... ۳۹

۲-۱۰. بهینه نمودن شرایط رشد سویه های *کاندیدا آلبیکنس* ۴۰
۲-۱۱. تشکیل بیوفیلم *کاندیدایی* به روش میکروتیتر ۴۱
۲-۱۱-۱. تشکیل بیوفیلم در پلیت های۹۶ خانه ای ۴۱
۲-۱۱-۲. تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح پوشش داده شده با نانوذرهTiO_2 ..... ۴۱
۲-۱۱-۲-۱. پوشش دهی سطوحPVC ، شیشه و کاتتر ۴۱
۲-۱۲. روش های جدا کردن بیوفیلم از روی سطوح ۴۳
۲-۱۲-۱. روش Scrapping ۴۳
۲-۱۲-۲. روش تریپسین ۴۳
۲-۱۲-۳. روش حمام اولترا سونیک ۴۴
۲-۱۳. ارزیابی بیوفیلم با تکنیک های مختلف ۴۴
۲-۱۳-۱. اندازه گیری وزن خشک ۴۴
۲-۱۳-۳. روش MTT ۴۵
۲-۱۳-۳. روش XTT ۴۶
۲-۱۳-۴. روش بررسی فعالیت آنزیمATPase ۴۶
۲-۱۳-۵. بررسی با میکروسکوپ الکترونی ۴۷
۲-۱۴. آزمون های آماری ۴۷
فصل سوم : نتایج ۴۸
۳-۱. نتایج حاصل از شناسایی سویه های *کاندیدا* ۴۹
۳-۲. نتایج حاصل از ارزیابی میزان حساسیت گونه های *کاندیدا* نسبت به داروی فلوکونازول با استفاده از روش دیسک دیفیوژن ۵۰
۳-۳. نتایج حاصل از سنتز نانوذرهTiO_2 ..... ۵۰
۳-۴. نتایج حاصل از XRD ۵۰
۳-۵. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۵۱

۳-۶. نتایج میزان حساسیت سویه های‌حساس و مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به نانوذرات TiO۲، TiO۲ فتوکاتالیست، EDTA و فلوکونازول ۵۲
۳-۶-۱. نتایج حاصل از ارزیابی میزان حساسیت‌سویه حساس *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به نانوذرات TiO۲،TiO۲ فتوکاتالیست، EDTA و فلوکونازول ۵۲
۳-۶-۲. نتایج حاصل از ارزیابی میزان حساسیت‌سویه مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به نانوذرات TiO۲، TiO۲ فتوکاتالیست، EDTA و فلوکونازول ۵۳
۳-۷. نتایج حاصل از تعیین وزن خشک بیوفیلم تیمار شده با نانوذرهTiO۲، EDTA و فلوکونازول ۵۴
۳-۸. نتایج تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر وارزیابی اثر نانوذرات TiO۲، TiO۲ فتوکاتالیست، EDTA و فلوکونازول به روش MTT ۵۵
۳-۹. ارزیابی نتایج تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر و اثر نانوذرهTiO2، بیوساید EDTA و فلوکونازول به روش XTT ۵۶
۳-۱۰. نتایج مربوط به تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح کاتترPVC و شیشه پوشش داده شده با نانوذره TiO۲ ..... ۵۷
۳-۱۰-۱. نتایج حاصل از تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح کاتتر، PVC و شیشه پوشش داده شده با نانوذره TiO۲ به روش MTT ۵۷
۳-۱۰-۱-۱. نتایج حاصل از بیوفیلم جدا شده با روشScrapping ۵۷
۳-۱۰-۱-۲. نتایج حاصل از بیوفیلم جدا شده با روش تریپسین ۵۸
۳-۱۰-۱-۳. نتایج حاصل از بیوفیلم جدا شده با روش حمام اولترا سونیک ۵۸
۳-۱۰-۲. نتایج حاصل از تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح کاتتر، PVC و شیشه پوشش داده شده با نانوذره TiO۲ به روش XTT ۵۹
۳-۱۰-۲-۱. نتایج حاصل از بیوفیلم جدا شده با روشScrapping ۵۹
۳-۱۰-۲-۲. نتایج حاصل از بیوفیلم جدا شده با روش تریپسین ۵۹

۳-۱۰-۲-۳. نتایج حاصل از بیوفیلم جدا شده با روش حمام اولترا سونیک ۶۰
۳-۱۱. نتایج بررسی بیوفیلم با روش ATPase..... ۶۰
۳-۱۱-۱. نتایج حاصل از بررسی میزانATP بیوفیلم تیمار شده با نانوذرهTiO_2، EDTA و فلوکونازول..... ۶۰
۳-۱۱-۲. نتایج حاصل از بررسی میزانATP بیوفیلم های تشکیل شده بر روی سطوح کاتتر، PVC و شیشه پوشش داده شده با نانوذرهTiO_2..... ۶۱
۳-۱۲. نتایج حاصل از بررسی بیوفیلم با روش میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۶۱
۳-۱۲-۱. نتایج حاصل از تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح شیشه پوشش داده شده با نانوذرهTiO_2 در مقایسه با نمونه کنترل..... ۶۱
۳-۱۲-۲. نتایج حاصل از تشکیل بیوفیلم بر روی سطوحPVC پوشش داده شده با نانوذرهTiO_2 در مقایسه با نمونه کنترل..... ۶۲
۳-۱۲-۳. نتایج حاصل از تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح کاتتر پوشش داده شده با نانوذرهTiO_2 در مقایسه با نمونه کنترل..... ۶۲
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها.....۶۳
فهرست منابع..... .....۷۴
چکیده انگلیسی..... .....۹۲

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. شمای XRD از نانوذره TiO۲..... ۵۰
نمودار ۳-۲. نتایج تعیین وزن خشک بیوفیلم تیمار شده با نانوذره TiO۲، EDTA و فلوکونازول ۵۵
نمودار ۳-۳. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم تیمار شده با نانوذر ات TiO۲، TiO۲ فتوکاتالیست، EDTA و فلوکونازول به روش MTT..... ۵۶
نمودار ۳-۴. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم تیمار شده با نانوذر ه TiO۲، EDTA و فلوکونازول به روش XTT..... ۵۷
نمودار ۳-۵. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم جدا شده با روشScrapping ۵۷
نمودار ۳-۶. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم جدا شده با روش تریپسین ۵۸
نمودار ۳-۷. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم جدا شده با روش حمام اولتراسونیک ۵۸
نمودار ۳-۸. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم جدا شده با روش Scrapping ۵۹
نمودار ۳-۹. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم جدا شده با روش تریپسین ۵۹
نمودار ۳-۱۰. جذب نوری بیوفیلم سویه های حساس و مقاوم جدا شده با روش حمام اولتراسونیک ۶۰
نمودار ۳-۱۲. لگاریتم میزان جذب نوری ATP با تیمار نانوذره TiO۲، EDTA و فلوکونازول ۶۰
نمودار ۳-۱۳. لگاریتم میزان جذب نوریATP سطوح کاتتر،PVC، شیشه پوشش دهی شده با نانوذره TiO۲..... ۶۱

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* تشکیل شده بر سطح کاتتر متشکل از مخمرها، هایف ها و شبکه گسترده پلیمری خارج سلولی.....۴

شکل ۱-۲. ساختار ناهمگون بیوفیلم با اجتماع میکروارگانیسم ها، جریان مواد غذایی وکانال های آبی.....۵

شکل ۱-۳. مراحل تشکیل بیوفیلم.....۸

شکل ۱-۴. مراحل سنتز ارگوسترول و فارنزول.....۱۳

شکل ۱-۵. فرمول گسترده شیمیایی مولکول EDTA.....۲۰

شکل ۲-۱. مراحل واکنش لوسیفرین و لوسیفراز.....۴۷

شکل ۳-۱. تصویر تشکیل لوله زایا.....۴۹

شکل ۳-۲. تصویر SEM پودر نانوذرات TiO_2.....۵۱

شکل ۳-۳. تصویر SEM زیر لایه شیشه پوشش داده شده با نانوذرات TiO_2.....۵۱

شکل ۳-۴. بیوفیلم تشکیل شده بر روی شیشه بدون پوشش دهی.....۶۱

شکل ۳-۵. شیشه پوشش دهی شده با نانوذره TiO_2.....۶۱

شکل ۳-۶. بیوفیلم تشکیل شده بر روی PVC بدون پوشش دهی.....۶۲

شکل ۳-۷. PVC پوشش دهی شده با نانوذره TiO_2.....۶۲

شکل ۳-۸. بیوفیلم تشکیل شده بر روی کاتتر بدون پوشش دهی.....۶۲

شکل ۳-۹. کاتتر پوشش دهی شده با نانوذرهTiO_2.....۶۲

فصل اول

مقدمه

و

مروری بر مطالعات گذشته

یکی از معضلات پزشکی امروز وجود عفونت ها ی بیمارستانی بویژه عفونت کاندیدیازیس می باشد که طیف وسیعی از بیماری ها را ایجاد می کند. هرچند پیشرفت های زیادی در کنترل عفونت های بیمارستانی از زمان این مشاهدات صورت گرفته است امّا عفونت های بیمارستانی به عنوان یک منبع مهم بیماریزایی و عامل مرگ و میر همچنان ادامه دارد [۱ و ۲]. به طوری که تقریباً ۱۰-۵٪ بیماران بستری شده در آمریکا در طی زمان بستری، عفونت کاندیدایی را تجربه می کنند. این رقم در کشور های در حال توسعه بالاتر می باشد و سالانه ۴-۲ میلیون مورد عفونت بیمارستانی در این کشورها اتفاق می افتد، بطوری که یازدهمین علّت مرگ و میر در این کشورها می باشد. رشدروز افزون تعداد بیماران مبتلا به نقص ایمنی ازیک طرف و افزایش عفونت های قارچی مقاوم به آنتی بیوتیک ها و عفونت های کاندیدیازیس ناشی از بیوفیلم روی کاتتر از طرف دیگر یک چالش اساسی ای را در پیش روی ما قرار داده است [۳ و ۴]. امروزه تکنولوژی مدرن، امکان استفاده از وسایل جدید پزشکی را فرآهم آورده است. استفاده از کاتترهای وریدی، ادراری، دریچههای پروستتیک، مفاصل مصنوعی ، پروتزها و سایر ایمپلنتها در علوم پزشکی متداول می باشد. ابتلاء به عفونت کاندیدایی پس از استفاده از اینگونه تجهیزات به عنوان چهارمین عامل عفونت های بیمارستانی مطرح می باشد. گزارشات نشان می دهد که حداقل نیمی از عفونت های بیمارستانی در ارتباط با وسایل پزشکی

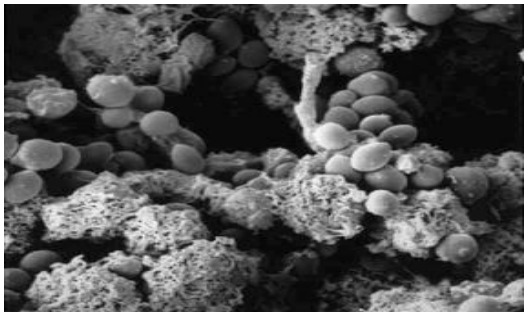
می باشند که عواقب این گونه عفونت ها در برخی موارد بسیار وخیم بوده بطوریکه به برداشت و حذف این وسایل پزشکی می انجامد وحتی در مراحل پیشرفته منجر به مرگ و میر بیماران می شود [۵ و ۶].

میکروارگانیسم های مختلف که توانایی تشکیل بیوفیلم رابر روی سطوح‌دارند می توانند بر روی ابزار های پزشکی تجمع یافته و با کلنیزاسیون و ایجاد عفونت مشکلات خاصی را در درمان ایجاد کنند. از جمله این میکروارگانیسم ها گونه های *کاندیدا* هستند که توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی مواد سنتتیک را دارا می باشند. این امر نه تنها موجب پایداری عفونت های قارچی می شود بلکه‌می تواند با تسهیل چسبندگی سایر میکروارگانیسم ها منجر به‌بیماری های صعب العلاج‌قارچی گردد [۷ و ۸]. بخش اعظم اجتماع میکروبی موجود در طبیعت را بیوفیلم ها تشکیل می دهند که تحت شرایط مختلف می توانند مفید یا مضر واقع شوند [۹]. از جمله فواید بیوفیلم، نقش آنها در تجزیه فاضلاب و پسماندهای صنعتی و نیتریفیکاسیون می باشد [۱۰]. امروزه بیوفیلم ها درعلم پزشکی بسیار مورد توجه قرار دارند زیرا می توانند مشکل ساز باشند، که این مسئله ناشی از ویژگی های بیوفیلم ها از جمله مقاومت بالا در برابر سیستم ایمنی، مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت در برابر بیوسایدها، پرتوها و ..... می باشد [۱۱]. طبق گزارش سازمان ملی بهداشت آمریکا (National Institutes of Health)، حدود ۸۰٪ عفونت های بیمارستانی توسط بیوفیلم ها ایجاد می شوند که این امر بیانگر نقش مهم آن در ایجاد بیماری های عفونی می باشد [۱۲].

۱-۱. ساختار بیوفیلم

به لحاظ ساختاری بیوفیلم‌ها اجتماع مستقل و پیچیده ای از ارگانیسم‌های تجمع‌یافته برروی سطوح می باشند. انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها قادرند در ساختار بیوفیلمی رشد کنند. بیوفیلم‌ها می تواند متشکل از یک جمعیت یک گونه ای یا یک اجتماع چند گونه ای میکروبی باشند.

اینگونه ارگانیسم‌ها در یک بستر پلی‌ساکاریدی محصور می شوند که بر روی هر سطحی بویژه سطوح زنده مانند بافت ها و همچنین سطوح غیر زنده وسایل پزشکی مانند پروتزهای مصنوعی مورد استفاده و ابزارها مانند سوند ها وایمپلنت ها، همچنین سیستم های آب آشامیدنی و لوله کشی ها می توانند تشکیل شوند [۵ و ۶].



شکل ۱-۱. بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* تشکیل شده بر سطح کاتتر متشکل از مخمرها، هایف ها و شبکه گسترده پلیمری خارج سلولی

۱-۲. تشکیل بیوفیلم

تشکیل بیوفیلم فرآیندی پیچیده و پویاست. اغلب سطوح توسط مواد غذایی، چربی ها وپروتئین ها آغشته می شوند و میکروارگانیسم ها با اتصال غیر قابل برگشت به این سطوح می چسبند. سپس میکروارگانیسم ها رشد و تکثیر می نمایند و همزمان پلیمرهای خارج سلولی تولید می کنند که باعث می شود میکروارگانیسم ها در یک ماتریکس اگزوپلیمری، قرار گیرند [۱۳]. این ماتریکس اگزوپلیمری حاوی پلی ساکارید، پروتئین ها، فسفولیپید ها و اسیدهای نوکلئیک و سایر مواد پلیمری هیدراته می باشد این ماتریکس پوشش محکمی را به وجود می آوردکه از خشک شدن جمعیت میکروبی جلوگیری می کند. چنین ماتریکسی با جمع آوری مواد غذایی و جلوگیری از دسترسی بیوساید ها و مواد شیمیایی مضر، از سلول های بیوفیلم محافظت می کند [۱۳ و ۱۴]. در داخل این ماتریکس،