

The Killing effect of Silver Nanoparticles and Direct Electric Current Induction on *Leishmania major* Promastigotes In Vitro

Mehdi Karimi¹, Abdolhossein Dalimi^{2*}, Farnoosh Jamei³, Fatemeh Ghaffarifar²,
Abbas Dalimi⁴

- 1- M.Sc., Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Professor, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Ph.D. Candidate, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- M.Sc. Student, Department of Electrical Power Engineering, Saveh Branch of Islamic Azad University, Saveh, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Received: 06/May/2015, Accepted: 06/Oct/2015

Abstract

Objective: Worldwide, *Leishmania major* is one of the major causes of cutaneous leishmaniasis, including Iran. In the present study we investigate the effect of a direct electricity current in combination with silver nanoparticle on the killing of *Leishmania major* in vitro.

Methods: We evaluated the effects of different concentrations of silver nanoparticles against *Leishmania major* promastigotes in vitro, then the half maximal inhibitory concentration (IC50) of the nanoparticles was determined. In the second step, the killing effect of silver nanoparticles alone or in combination with 3mA of direct electric current was assessed in promastigote cultures for 10 minutes. Next, we evaluated the survival rate of treated promastigotes with the MTT assay.

Results: The parasite count showed that the various concentrations of silver nanoparticles significantly decreased the numbers of live promastigotes over time compared with the control group after 24, 48 and 72 hours of culture. The IC50 of the nanoparticles was 39.8 µg/ml after 48 hours of cultivation. Promastigote mortality occurred in 33.5% with the use of silver nanoparticles alone at concentrations of 160 µg/ml and 100% when combined with 3 mA direct current electricity after 10 minutes.

Conclusion: Silver nanoparticles alone did not completely kill *Leishmania major* promastigotes. However, the combined use of both direct current electricity and silver nanoparticles had a significant synergistic effect on promastigote mortality.

Keywords: *Leishmania major*, Silver nanoparticle, Direct current of electricity, MMT assay

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No.3, Pages: 87-96

تأثیر نانو ذرات نقره و القای جریان الکتریسته مستقیم در کشندگی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی

مهدی کریمی^۱، عبدالحسین دلیمی^{۲*}، فرنوش جامعی^۳، فاطمه غفاری فر^۴، عباس دلیمی^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی برق، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۷/۱۴

دریافت مقاله: ۹۴/۰۲/۱۶

چکیده

هدف: لیشمانیا ماژور یکی از عوامل مهم لیشمانیوز جلدی در بسیاری از کشورهای ایران است. در مطالعه حاضر تأثیر مصرف همزمان نانو ذرات نقره و القای جریان الکتریسته در کشندگی لیشمانیا ماژور در محیط کشت بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره در شرایط برون تنی علیه پروماستیگوت لیشمانیا ماژور بررسی شد. سپس میزان ممانعت از رشد نانو ذرات محاسبه شد. در مرحله دوم، اثر کشندگی نانو ذرات نقره به تنهایی یا در ترکیب با ۳ میلی‌آمپر جریان الکتریسته مستقیم در محیط کشت پروماستیگوت به مدت ۱۰ دقیقه بررسی و سپس میزان بقای پروماستیگوت‌ها با استفاده از آزمون MTT محاسبه شد. **نتایج:** پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت انگل، شمارش تعداد انگل نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره با گذشت زمان تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد که تعداد آن‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/05$). میزان ممانعت از رشد نانو ذره نقره ۴۸ ساعت پس از کشت ۳۹/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نانو ذرات نقره در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر در میلی‌متر پس از ۱۰ دقیقه مصرف به تنهایی باعث مرگ و میر ۳۳/۵ درصد و همراه با القای ۳ میلی‌آمپر جریان مستقیم الکتریسته باعث مرگ و میر ۱۰۰ درصد پروماستیگوت‌ها شد. **نتیجه‌گیری:** استفاده از نانو ذرات نقره گرچه سبب کشتن پروماستیگوت‌های لیشمانیا می‌شود ولی صد در صد آن‌ها را از بین نمی‌برد. ولی با استفاده همزمان جریان الکتریسته و نانو ذرات نقره، میزان مرگ و میر پروماستیگوت‌ها به شدت افزایش می‌یابد.

کلیدواژگان: لیشمانیا ماژور، نانو ذرات نقره، جریان مستقیم الکتریسته، آزمون MTT

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴، صفحات: ۸۷-۹۶

مقدمه

سلولی اجباری از جنس لیشمانیا از راسته کیتوپلاست‌داران (Kinetoplastids) در ماکروفاژهای ترجیحاً پوست، کبد،

لیشمانیوزیس (Leishmaniasis) جزو بیماری‌های عفونی مهم دنیاست که توسط تک یاخته‌های نسجی خونی داخل

تاثیر نانوذرات نقره و القای جریان الکتریسته مستقیم بر لیشمانیا ماژور

ماندگاری طولانی دارد. از طرفی شواهد و مدارک زیادی نیز وجود دارد که جریان الکتریکی می تواند رشد باکتری ها، قارچ ها و انگل ها از جمله لیشمانیا را مهار کند و بهبودی زخم ها را تسریع نماید [۱۶-۲۴].

هدف از انجام این مطالعه مقایسه تأثیر نانو ذرات نقره و القای جریان مستقیم الکتریسته و همچنین استفاده همزمان آن ها در کشتندگی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) در شرایط برون تنی است.

مواد و روش ها

تهیه انگل لیشمانیا

سویه استاندارد (MRHO.IR.75.ER) از انستیتو رازی تهیه و پاساژهای متوالی از آن تهیه شد.

کشت و نگهداری انگل

در این مطالعه از دو محیط (NNN (Novy-MacNeal) و (RPMI1640 (Roswell Nicolle medium) تغییر یافته و (Park Memorial Institute) استفاده شد. ابتدا انگل در محیط NNN تکثیر یافت. سپس در محیط RPMI1640 کشت داده شد؛ به منظور کشت انگل لیشمانیا، محیط RPMI1640 به صورت آماده از شرکت Gibco (آلمان) خریداری شد. برای جلوگیری از رشد باکتری ها ۱۰۰ واحد/ میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر استرپتومایسین و به عنوان ماده مکمل سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum: FBS) به میزان ۱۲-۱۵ درصد به محیط اضافه شد. سپس فلاسک ها به انکوباتور ۲۴ درجه سانتی گراد منتقل و هر روز با میکروسکوپ invert بررسی شد. در صورتی زرد شدن رنگ محیط و ورود پروماستیگوت ها به فاز ایستا، محیط کشت جدید به آن ها اضافه شد. این کار تا زمانی انجام شد که تعداد انگل به میزان مورد نیاز افزایش یافت. برای شمارش تعداد انگل از لام نئوبار و برای تعیین تعداد انگل در هر میلی لیتر از فرمول زیر استفاده شد.

طحال، مغز استخوان ایجاد می شود. لیشمانیوزیس یکی از مهم ترین عوامل میرایی و ناخوشی در چندین کشور است. تخمین زده شده که بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مورد تهدید این بیماری قرار دارند [۱].

در استفاده از روش های درمانی مختلف به علت مواجهه شدن با مشکلاتی مانند عود بیماری، مقاومت به داروها، عوارض جانبی داروها، ایجاد عفونت ثانویه باکتریایی، هزینه بالا، گزارش چندین مورد اپیدمی بیماری به خصوص در افراد با نقص ایمنی وجود دارد. لذا تحقیقات در مورد معرفی داروهای جدید ضد لیشمانیا یا یک واکسن مناسب در جریان است [۲].

در درمان سیستمی معمولاً از ترکیبات آنتی-موان (*Antimony*) ۵ ظرفیتی استفاده می شود. این ترکیبات، داروی درجه اول در درمان لیشمانیوز به شمار می رود و بیش از یک قرن است که مصرف می شود.

برای درمان ضایعه پوستی لیشمانیایی تاکنون از ابزارهای فیزیکی و ترکیبات مختلفی اعم از داروهای شیمیایی، گیاهی و حتی نانو ذرات استفاده شده است. در مورد آثار نانو ذرات مختلف از جمله نقره روی پروماستیگوت و بهبودی زخم لیشمانیایی نیز مطالعاتی انجام شده است [۳-۱۵].

نقره برای درمان عفونت ها به مدت چند قرن استفاده شده است ولی با پیشرفت نانو تکنولوژی، استفاده از نقره به شکل نانو ذره، راه های درمانی جدیدی را گشوده است [۱۳]. فلز نقره زمانی که به ابعاد بسیار کوچک در حد نانومتر تبدیل می شود، خاصیت میکروب کشی آن به حدی افزایش می یابد که از آن به منظور ماده ضد عفونی کننده استفاده می شود. اندازه نانو نقره ها در حد ۲۵ نانومتر است و به دلیل بالا بودن سطح مقطع آن در این مقیاس در برخورد به سلول ها خاصیت جالب توجهی از خود بروز می دهد که از آن به ممانعت با متابولیسم سلولی (الکترونی) یاد می شود که جلوی تنفس، رشد، تکثیر و زاد و ولد هر گونه باکتری یا قارچی را می گیرد. مزایای استفاده از محصولات نانو نقره این است که خاصیت ضد باکتری، ضد قارچی و ضد ویروسی با غلظت های کم و مدت زمان

N (تعداد انگل در هر میلی لیتر) = میانگین تعداد انگل در ۴
خانه WBC نوبار $1000 \times 10 \times 1000$

آماده سازی نانو ذره نقره

در این مطالعه از محلول نانو نقره ۳۰۰۰ ppm که توسط شرکت US Research Nanomaterials آمریکا تولید می شود و توسط شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان مشهد توزیع می شود، استفاده شد. اندازه ذرات نقره در این محلول ۲۰ نانومتر است که درصد خلوص آن بنا بر اعلام شرکت سازنده ۹۹/۹۹ درصد است. این ترکیب دارای ویژگی های ضد عفونی کنندگی (ضد قارچ، باکتری و ضد ویروس) است. نانو ذره نقره مورد استفاده به صورت محلول و به رنگ سیاه است. در این پژوهش غلظت های ۱۰۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۳، ۷/۸، ۳/۹، ۱/۹۵ از نانو ذره تهیه شد.

تولید جریان مستقیم

برای تبدیل جریان متناوب (Alternating Current: AC) به جریان مستقیم (Direct Current: DC) از دستگاه واریاک (Variac) استفاده شد این دستگاه به عنوان ترانسفورماتور برای کاهش یا افزایش ولتاژ استفاده می شود. برای اندازه گیری دقیق تر ولتاژ، از دستگاه مولتی متر (Multimeter) استفاده شد. در مطالعه حاضر پس از بهینه سازی جریان های مختلف الکتریسته از لحاظ تولید گرما و تغییر pH محیط، جریان مستقیم ۳ میلی آمپر به مدت ۱۰ دقیقه انتخاب شد.

الکترودهای استفاده شده در محیط کشت

با توجه به این که محیط کشت RPMI 1640 و همچنین سایر محیط کشت هایی که به منظور کشت پروماستیگوت استفاده می شود حاوی مقادیر زیادی آب و انواع نمک است، بنابراین از مفتول های طلا به عنوان الکترود استفاده شد که دارای بالاترین رسانایی، کمترین میزان تجزیه و کمترین مقدار گرمای تولید شده بود.

گروه های مورد مطالعه

مجموعاً چهار گروه شامل گروه شاهد بدون مواجهه، گروه مواجهه با جریان الکتریسته، گروه مواجهه با نانو ذرات نقره، گروه مواجهه همزمان با جریان الکتریسته و ذرات نقره مطالعه شد.

ارزیابی میزان بقای پروماستیگوت آلوده به انگل

برای ارزیابی میزان بقای پروماستیگوت ها در گروه های مختلف، از آزمون MTT (Microculture Tetrazolium Assay) استفاده شد. بدین ترتیب که در پلیت های ۴۸ خانه ای ۳۵۰ میکرولیتر محلول RPMI1640 و ۱۰ FCS درصد (Fetal Calf Serum) حاوی 2×10^6 پروماستیگوت به هر چاهک اضافه شد. سپس چاهک ها با اضافه کردن غلظت های مختلف نانو ذره یا تحت تأثیر قرار دادن با الکتریسته در گروه های مختلف آزمایش شد. یک چاهک نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هر چاهک برداشته شد و به چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای U شکل اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع و دور ریخته شد به طوری که سلول ها در ته پلیت ته نشین شدند. پس از آن ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر RPMI و سپس ۱۰ میکرولیتر MTT به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس پلیت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع و دور ریخته شد به طوری که سلول ها در ته پلیت ته نشین شدند. به هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) اضافه و به هم زده شد. سپس یک بار دیگر سانتریفیوژ انجام و مایع رویی برای خواندن استفاده شد. جذب حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA Reader) خوانده شد. پس از به دست آوردن جذب نوری نمونه ها، از فرمول زیر درصد کشتندگی محاسبه شد.

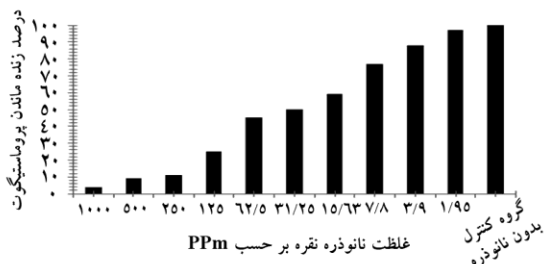
تأثیر نانوذرات نقره و القای جریان الکتریسته مستقیم بر لیشمانیا ماژور

برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به صورت دو به دو بین گروه‌های مختلف از آزمون T-test استفاده شد. همچنین استفاده از ANOVA (of Variance: One-Way ANOVA) استفاده شد. همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به صورت دو به دو بین گروه‌های مختلف از آزمون T-test استفاده شد. قابل ذکر است که از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) برای بررسی فرض طبیعی بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی میزان اثر بخشی نانو ذره نقره بر اساس شمارش تعداد انگل

پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت انگل در مواجهه با نانو ذرات نقره و شمارش پروماستیگوت‌ها با لام نئوبار، کاهش تعداد انگل‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). ولی پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت انگل، شمارش تعداد انگل نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره به تدریج تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد که این کاهش در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/05$). در شکل ۱ اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره نقره بر تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور پس از ۴۸ ساعت مواجهه نشان داده شده است.



شکل ۱ درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از ۴۸ ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره

$$AT - جذب نوری نمونه, AB - جذب نوری بلانک, AC = 100 \times \frac{[AT-AB]}{[AC-AB]}$$

جذب نوری شاهد.

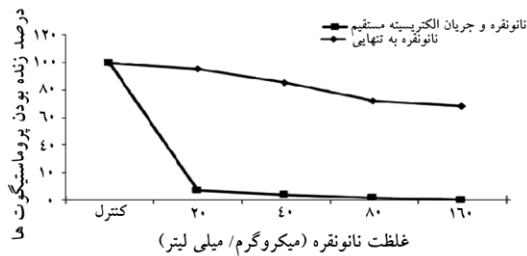
روش انجام آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها IC₅₀

این آزمون بر پایه ممانعت یا مهار رشد تعداد مشخصی انگل زنده و فعال لیشمانیا ماژور به فرم پروماستیگوت (تعداد اولیه 2×10^6 پروماستیگوت) در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت انجام شد. ابتدا انگل‌های زنده و فعال لیشمانیا ماژور که به صورت فرم پروماستیگوت در محیط وجود دارند در روزهای متوالی شمارش شدند و هر موقع که تعداد انگل در هر میلی‌لیتر به 2×10^6 رسید تعداد انگل لازم برای مطالعه به دست آمده است. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل در زیر هود با شرایط کاملاً استریل قرار داده شد و سپس به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از انگل حاوی پروماستیگوت و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI1640 + FCS ۲۶ درصد اضافه شد. بعد از این عمل، غلظت‌های مختلف نانو ذره به چاهک‌ها اضافه شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شده است. علاوه بر این؛ یک پلیت به مدت ۲۴ ساعت، پلیت دوم به مدت ۴۸ ساعت و پلیت سوم به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. همچنین در هر پلیت، یکی از چاهک‌ها فقط دارای پروماستیگوت و محیط بود که این چاهک به عنوان کنترل آزمون در نظر گرفته شد. پس از سپری شدن زمان‌های مورد نظر انگل‌ها شمارش شد و IC₅₀ (Inhibitory Concentration of 50%) هر سه روز توسط نرم‌افزار Prism 5 محاسبه و میزان ممانعت از رشد سنجیده شد.

تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین متغیرهای مورد مطالعه در گروه‌های مختلف از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way Analysis)

است. به طوری که در اثر مواجهه پروماستیگوت‌ها با غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره، ۶۶/۵ درصد آن‌ها زنده مانده‌اند.



شکل ۲ درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره به تنهایی و همراه با ۳ میلی‌آمپر جریان مستقیم الکتریسته

جریان مستقیم و نانو ذرات نقره

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده همزمان با جریان مستقیم ۳ میلی‌آمپر و نانو ذرات نقره با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۱۰ دقیقه پس از تیمار با استفاده از روش شمارش تعداد انگل محاسبه شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است درصد مرگ و میر پروماستیگوت‌ها در اثر مواجهه با غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره ۳۳/۵ درصد بوده ولی در اثر استفاده همزمان با جریان الکتریسته این درصد به ۱۰۰ ارتقا یافته است.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره در شرایط برون تنی باعث کاهش تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود. مقایسه تعداد انگل در گروه کنترل با گروه‌های آزمون در زمان‌های مختلف نشان داد که اثر بخشی نانو ذرات نقره بر پروماستیگوت‌های انگل وابسته به غلظت و زمان است و با افزایش غلظت نانو ذرات و زمان مواجهه، تعداد انگل نیز کاهش می‌یابد. در مطالعه حاضر در مدت ۴۸ ساعت مواجهه بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی از رشد انگل در غلظت

با استفاده از روش شمارش لام نئوبار مقدار IC50 استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism5 بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت معنی‌دار نبود، اما بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت مقدار IC50 برای پروماستیگوت‌ها مقدار ۳۹/۸ از غلظت نانو ذرات نقره به دست آمد.

درصد انگل‌های زنده در اثر مواجهه با نانو ذرات نقره و جریان الکتریسته جریان مستقیم

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با جریان‌های مستقیم با آمپراژهای (۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۵ میلی‌آمپر) ۱۰ دقیقه پس از اعمال جریان با استفاده از روش شمارش تعداد انگل محاسبه شد. نتایج در جدول ۱ آمده است. طبق نتایج به دست آمده در جدول ۱، با افزایش آمپراژ جریان مستقیم الکتریسته، میزان مرگ و میر پروماستیگوت‌ها نیز افزایش یافته است.

جدول ۱ درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از ۱۰ دقیقه مواجهه با آمپراژهای مختلف جریان مستقیم الکتریسته

آمپراژ (میلی‌آمپر) جریان مستقیم	درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها	درصد مرگ و میر پروماستیگوت‌ها
۰	۹۹/۵	۰/۵
۰/۷۵	۵۱/۸	۴۸/۲
۱/۵	۴۴/۸	۵۵/۲
۳	۳۳/۵	۶۶/۵
۵	۲۵/۵	۷۴/۵

نانو ذرات نقره به تنهایی

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره به تنهایی با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ دقیقه پس از تیمار با استفاده از روش MTT محاسبه شد (شکل ۲). طبق نتایج حاصل در شکل ۲، با افزایش غلظت نانو ذرات نقره میزان کشندگی آن نیز افزایش یافته

تأثیر نانوذرات نقره و القای جریان الکتریسته مستقیم بر لیشمانیا ماژور

دریافتی از منبع تغذیه به مدت ۳۵ دقیقه و ولتاژهای ۶، ۹، ۱۲ دریافتی از منبع تغذیه در مدت کمتر از ۱۰ دقیقه می‌تواند موجب از بین رفتن حیات پروماستیگوت‌های انگل در شرایط برون تنی شود [۲۴]. در مطالعه حاضر که بر مبنای جریان الکتریکی (میلی آمپر به جای ولتاژ) طراحی شده است جریان بسیار ضعیف ۳ میلی آمپری در ۱۰ دقیقه باعث مرگ و میر ۶۶/۵ درصد پروماستیگوت‌ها می‌شود. برای افزایش کارایی نانو ذراتی مانند نانو ذرات نقره می‌توان از این جریان الکتریکی استفاده کرد. در مورد کاربرد همزمان نانو ذرات نقره و الکتریسته تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده ولی برخی محققان، این نانو ذرات را همراه با نور ماورای بنفش ارزیابی کرده‌اند. در مطالعه الله وردیوف (Allahverdiyev) و همکاران که تأثیر نانو ذره نقره به همراه نور ماورای بنفش بر ضد لیشمانیوز پوستی ارزیابی شد نشان دادند که ترکیب نانو ذره به همراه نور ماورای بنفش سبب ممانعت از تکثیر و فعالیت‌های متابولیکی پروماستیگوت می‌شود. همچنین پروماستیگوت‌هایی که تحت تأثیر نانو ذره نقره همراه با نور ماورای بنفش قرار گرفته بودند غشای خود را از دست دادند و آن‌هایی که تأثیر نانو ذره نقره در شرایط تاریکی قرار گرفتند شکل و اندامک‌های داخلی‌شان مشخص نبود ولی در گروه کنترل شکل و اندامک‌های داخلی حفظ شده بود [۷].

در مطالعه جبالی و همکاران (۲۰۱۳) که تأثیر نانو ذره نقره، طلا، دی اکسید تیتانیوم، دی اکسید روی و دی اکسید منیزیم زیر نور ماورای بنفش، مادون قرمز و شرایط تاریکی ارزیابی شد؛ نشان دادند که بیشترین فعالیت ضد لیشمانیایی را نقره دارد و نور ماورای بنفش و مادون قرمز نیز هر دو دارای فعالیت ضد لیشمانیایی هستند [۹].

طبق نتایج مطالعه حاضر با افزودن جریان الکتریسته به نانو ذره نقره میزان کشندگی آن نیز به شدت افزایش می‌یابد؛ به طوری که در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر در میلی‌متر پس از ۱۰ دقیقه مصرف آن همراه با القای ۳ میلی آمپر جریان مستقیم الکتریسته ۱۰۰ درصد پروماستیگوت‌ها از بین می‌رود. این در حالی است که مصرف این غلظت از نانو ذره به تنهایی پس از

۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیده شد. در مورد دلیل این واقعه، مشخص شده است که نانو ذرات نقره گونه‌های واکنش گر اکسیژن تولید می‌کنند که انگل لیشمانیا به آن بسیار حساس است [۱۴].

مجبلی و همکاران (۲۰۰۹) غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره را در شرایط برون تنی و درون تنی روی انگل لیشمانیا ماژور بررسی کرده‌اند. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل سبب کاهش آماستیگوت‌ها می‌شود ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. همچنین غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره سبب کاهش معنی‌داری در اندازه میانگین زخم‌ها نمی‌شود [۱۴].

در مطالعه بایوکو (Baiocco) و همکاران (۲۰۱۰) که اثر کشندگی نانو ذره نقره بر ضد لیشمانیوز احشایی ارزیابی شد، نشان داده شد که نانو ذره نقره نسبت به ترکیبات آنتی‌موان تأثیر بیشتری در کشندگی لیشمانیا دارد [۵]. در مطالعه علمی و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر استفاده از نانو ذرات در درمان عفونت‌های انگلی، نشان داد که نانو ذره نقره، طلا، کیتوزان و اکسید فلزات روی لیشمانیا اثر کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارند [۸].

خسروی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای آثار نانو ذرات نقره بر پارامترهای زیستی لیشمانیا تروپیکا (*L. tropica*) از قبیل ریخت شناسی، فعالیت متابولیک، تکثیر، عفونت زایی، بقا در سلول میزبان و محیط کشت بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره از تکثیر و فعالیت متابولیکی پروماستیگوت‌ها ممانعت می‌کند. به طور مشخص نانو ذرات نقره بقای آماستیگوت در سلول میزبان را مهار می‌کند. آثار ضد لیشمانیایی نانو نقره در تاریکی ۱/۵ تا ۳ برابر و زیر نور ۲ تا ۶/۵ برابر بود [۱۵].

در مورد استفاده از جریان الکتریکی برای مهار رشد میکروارگانیسم‌ها و بهبود زخم مطالعات متعددی انجام شده [۱۶-۲۴] ولی در رابطه با لیشمانیا مطالعه محدودی انجام شده است. حجازی و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تأثیر جریان مستقیم الکتریسته بر بقای لیشمانیا ماژور نشان دادند که ولتاژ ۳

تحقیق قابل تعمیم به انسان یا حیوان است و این شاید یکی از محدودیت‌های تحقیق حاضر باشد. در واقع این تحقیق فقط مقدمه‌ای برای کارهای آینده در این زمینه است. معمولاً در بررسی آثار دارویی یک ترکیب شیمیایی، نانویی یا گیاهی ابتدا باید از مطالعات برون تنی شروع و در نهایت به انسان یا حیوان رسید. بنابراین برای درک بهتر اثر بخشی یک ترکیب ضد لیشمانیایی انجام مطالعه در مورد آثار آن در شرایط درون تنی ضروری و اجتناب‌ناپذیر است.

نتایج نشان داد استفاده از نانو ذرات نقره گرچه سبب کشتن محدود پروماستیگوت‌های لیشمانیا می‌شود ولی صد در صد آن‌ها را از بین نمی‌برد ولی با القای همزمان جریان الکتریسته و مصرف نانو ذره نقره، میزان کشندگی آن نیز به شدت افزایش می‌یابد؛ به طوری که در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر در میلی‌متر پس از ۱۰ دقیقه همراه با القای ۳ میلی‌آمپر جریان مستقیم الکتریسته ۱۰۰ درصد پروماستیگوت‌ها از بین می‌روند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است که بدین وسیله از کلیه همکاران محترم گروه و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

۱۰ دقیقه مواجهه با انگل، باعث مرگ و میر فقط ۳۳/۵ درصد و القای ۳ میلی‌آمپر از جریان الکتریسته به تنهایی با همان مدت زمان مواجهه با انگل، نیز باعث مرگ و میر ۶۶/۵ درصد پروماستیگوت‌ها شد که این نشان دهنده اثر هم‌افزایی مصرف نانو نقره و الکتریسته در کشندگی پروماستیگوت‌ها است ($P < 0/05$). شناخت مکانیسم این هم‌افزایی در کشندگی انگل در درون سلول‌های ماکروفاژ با توجه به فلز بودن نقره و خاصیت رسانا بودن آن می‌تواند افق‌های جدیدی در به‌کارگیری جریان الکتریسته برای درمان بیماری‌های عفونی باشد.

البته با توجه به این‌که الکتروود مورد استفاده از جنس طلا بوده است و نانو ذرات طلا نیز اثر کشندگی بر پروماستیگوت‌ها دارد [۱۰]؛ بنابراین برای دقت بیشتر، میزان مرگ و میر پروماستیگوت‌ها در گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه شاهد محاسبه شد. با توجه به این‌که برای الکتروولیز طلا به ۱۰ آمپر الکتریسته نیاز است و جریان الکتریسته مورد استفاده در این مطالعه بسیار کم بود (۳ میلی‌آمپر)؛ بنابراین الکتروولیز شدن فلز طلا و ورود آن به محیط کشت متفی است. دلیل دیگر این است که در گروه شاهد بدون جریان الکتریسته میزان مرگ و میر پروماستیگوت‌ها با وجود حضور فلز طلا در مجاورت آن‌ها بسیار کم و جزئی (نیم درصد) بوده است.

از طرفی؛ پروماستیگوت‌ها نسبت به آماستیگوت‌ها حساسیت بیشتری نسبت به ترکیبات ضد لیشمانیایی دارند؛ مسلماً با توجه به این موضوع نمی‌توان ادعا کرد که نتایج این

منابع

- [1] Garcia, LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed., Washington, DC: ASM Press 2007.
- [2] Grogil M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am J Trop Med Hyg 1992; 47(1): 117-26.
- [3] Soflaei S, Dalimi A, Abdoli A, Kamali M, Nasiri V, Shakibaie M, Tat M. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on *Leishmania infantum*. Comp Clin Pathol 2012; DOI 10.1007/s00580-012-1561-z
- [4] Beheshti N, Soflaei S, Shakibaie M, Yazdi

- MH, Ghaffarifar F, Dalimi A, Shahverdi AR. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: in vitro and in vivo studies. *J Trace Elem Med Biol* 2013; 27(3): 203-7.
- [5] Baiocco P, Ilari A, Ceci P, Orsini S, Gramiccia M, Di Muccio T, Colotti G. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and *Leishmania infantum* Proliferation. *ACS Med Chem Lett* 2010; 2(3): 230-3.
- [6] Soflaei S, Dalimi A, Ghaffarifar F, Shakibaie M, Shahverdi AR, Shafiepour M. In vitro antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on *Leishmania infantum*. *J Parasitol Res* 2012; Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/756568>
- [7] Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, Rafailovich M. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 2705-14.
- [8] Elmi T, Gholami S, Fakhari M, Azizi F. A review on the use of nanoparticles in the treatment of parasitic infections. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013, 23(102): 126-33.
- [9] Jebali A, Kazemi B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. *Toxicol In Vitro* 2013; 27(6): 1896-904.
- [10] Torabi N, Mohebbali M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Edrissian GH, Esmaili J, Charehdar S. Nanogold for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): An animal trial with methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis*. *JPHS* 2012; 1(1): 13-6.
- [11] Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sadraei J. in vitro study on cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iran J Parasitol* 2014; 9(1): 6-13.
- [12] Andreadou M, Liandris E, Gazouli M, Taka S, Antoniou M, Theodoropoulos G, Tachtsidis I, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Kasampalidis I, Ikonomopoulos J. A novel non-amplification assay for the detection of *Leishmania* spp. in clinical samples using gold nanoparticles. *J Microbiol Methods* 2014; 96: 56-61.
- [13] Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Lafia J, Amal R. Reversible antimicrobial photoswitching in nanosilver. *Small* 2009; 5(3): 341-4.
- [14] Mohebbali M, Rezayat MM, Gilani K, Sarkar S, Akhouni B, Esmaili J, Satvat T, Elikae S, Charehdar S, Hooshyar H. Nanosilver in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): an in vitro and in vivo study. *DARU* 2009. 17(4): 285-9.
- [15] Khosravi A, Sharifi I, Barati M, Zarean M, Hakimi-Parizi M. Anti leishmanial effect of nanosilver solutions on *Leishmania tropica* promastigotes by in vitro assay. *ZJRMS* 2011; 13(7): 8-12.
- [16] Rowley BA, McKenna JM, Chase GR, Wolcott LE. The influence of electrical current on an infecting microorganism in wounds. *Ann N Y Acad Sci* 1974; 238: 543-51.
- [17] Barranco SD, Spadaro JA, Berger TJ, Becker

- RO. In vitro effect of weak direct current on *Staphylococcus aureus*. Clin Orthop Relat Res 1974; (100): 250-5.
- [18] Szuminsky NJ, Albers AC, Unger P, Eddy JG. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. Phys Ther 1994; 74(7): 660-7.
- [19] Bigelow JB, Al-Husseni SA, Von recum AF, Park JB. Effect of electrical stimulation of canine skin and percutaneous device-skin interface healing. In: Brighton CT, Black J, Pollack SR (eds.). Electrical properties of bone and cartilage: Experimental effects and clinical applications. New York: Ny:Grune and Stratton. 1978; p: 289-310.
- [20] Alvarez OM, Mertz PM, Smerbeck RV, Eaglstein WH. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. J Invest Dermatol 1983; 81(2): 144-8.
- [21] Dalimi A, Ghasemikhah R, Hashemi Malayeri B. *Echinococcus granulosus*: lethal effect of low voltage direct electric current on hydatid cyst protoscoleces. Exp Parasitol 2005; 109(4): 237-40.
- [22] Rahma JH, Abdul-Wahid N, Al-Zubaidi FAA, Al-Mousawi NRH. Effect of electric current on the activity of the protoscolices of the *Echinococcus granulosus*. Kufa Med Journal 2011; 14(1): 21-9.
- [23] Puacz E, Elmborg LK. Evaluation study on the effect of three electric currents on the *Candida albicans* fungus cells. Polish J Environ Stud 2006; 15(2b): 1514-6.
- [24] Hejazi H, Eslami G, Dalimi A. The parasitocidal effect of electricity on *Leishmania major*, both in vitro and in vivo. Ann Trop Med Parasitol 2004; 98(1): 37-42.