Original Article

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

Mehdi Karimi[1], Abdolhossein Dalimi[2*], Farnoosh Jamei[3], Fatemeh Ghaffarifar[2], Abbas Dalimi[4]

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

مقاله اصیل

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

مهدی کریمی[1]، عبدالحسین دلیمی[2*]، فرنوش جامعی[3]، فاطمه غفاری فر[2]، عباس دلیمی[4]

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: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۴/۰۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۴/۰۷/۱۴

چکیده

هدف: لیشمانیا ماژور یکی از عوامل مهم لیشمانیوز جلدی در بسیاری از کشورها از جمله 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه بررسی و سپس میزان بقای پروماستیگوت‌ها با استفاده از آزمون MTT محاسبه شد.

نتایج: پس از گذشت ۲٤، ٤۸ 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 ($P<۰/۰۵$). میزان ممانعت از رشد نانو ذره نقره ٤۸ ساعت پس از کشت ۳۹/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. نانو ذرات نقره در غلظت ۱٦۰ 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 الکتریسیته 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

لیشمانیوزیس (Leishmaniasis) جزو بیماری‌های عفونی مهم دنیاست که توسط تک یاخته‌های نسجی خونی داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا از راسته کینتوپلاستداران (Kinetoplastids) در ماکروفاژهای ترجیحاً پوست، کبد،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

طحال، مغز استخوان ایجاد می‌شود. لیشمانیوزیس یکی از مهم‌ترین 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 روش‌های 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 به‌خصوص 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 آنتی‌موان (Antimony) ۵ ظرفیتی استفاده می‌شود. این ترکیبات، داروی درجه اول در درمان لیشمانیوز به شمار می رود و بیش از یک قرن است که مصرف می‌شود.

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 عفونت‌ها به‌مدت چند قرن استفاده شده است ولی با پیشرفت نانوتکنولوژی، استفاده از نقره به شکل نانو ذره، راه‌های درمانی جدیدی را گشوده است [۱۳]. فلز نقره زمانی که به ابعاد بسیار کوچک در حد نانومتر تبدیل می‌شود، خاصیت میکروب‌کشی آن به حدی افزایش می‌یابد که از آن به‌منظور ماده ضد عفونی کننده استفاده می‌شود. اندازه نانو نقره ها در حد ۲۵ نانومتر است و به‌دلیل 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 می‌شود که جلوی تنفس، رشد، تکثیر و زاد و ولد هر گونه باکتری یا قارچی را می‌گیرد. مزایای استفاده از محصولات نانو نقره این است که خاصیت ضد باکتری، ضد قارچی و ضد ویروسی با غلظت های کم و مدت زمان ماندگاری طولانی دارد. از طرفی شواهد و مدارک زیادی نیز وجود دارد که جریان الکتریکی می تواند رشد باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها از جمله لیشمانیا را مهار کند و بهبودی زخم‌ها را تسریع نماید [۱۶-۲۴].

هدف از انجام این مطالعه مقایسه تأثیر نانو ذرات نقره و القای جریان مستقیم الکتریسته و همچنین استفاده همزمان آن‌ها در کشندگی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) در شرایط برون تنی است.

مواد و روش‌ها

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-Nicolle medium) تغییر یافته و RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute) استفاده شد. ابتدا انگل در محیط NNN تکثیر یافت. سپس در محیط RPMI1640 کشت داده شد؛ به‌منظور کشت انگل لیشمانیا، محیط RPMI1640 به‌صورت آماده از شرکت Gibco (آلمان) خریداری شد. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها ۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر استرپتومایسین و به‌عنوان ماده مکمل سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum: FBS) به میزان ۱۲-۱۵ درصد به محیط اضافه شد. سپس فلاسک‌ها به انکوباتور ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و هر روز با میکروسکوپ invert بررسی شد. در صورتی زرد شدن رنگ محیط و ورود پروماستیگوت‌ها به فاز ایستا، محیط کشت جدید به آن‌ها 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 میلی‌لیتر از فرمول زیر استفاده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

N (تعداد انگل در هر میلی‌لیتر)= میانگین تعداد انگل در ٤ خانه WBC نئوبار×۱۰×۱۰۰۰

آماده‌سازی نانو ذره نقره

در این مطالعه از محلول نانونقره ۳۰۰۰ ppm که توسط شرکت US Research Nanomaterials آمریکا تولید می‌شود و توسط شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان مشهد توزیع می‌شود، 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 ویژگی‌های ضد عفونی کنندگی (ضد قارچ، باکتری و ضد ویروس) است.

نانو ذره نقره مورد استفاده به‌صورت محلول و به رنگ سیاه است. در این پژوهش غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ٦۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/٦۳، 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 به‌عنوان ترانسفورماتور برای کاهش یا افزایش ولتاژ استفاده می‌شود. برای اندازه‌گیری دقیق‌تر ولتاژ، از دستگاه مولتی‌متر (Multimeter) استفاده شد. در مطالعه حاضر پس از بهینه‌سازی جریان‌های مختلف الکتریسته از لحاظ تولید گرما و تغییر pH محیط، جریان مستقیم ۳ میلی‌آمپر به‌مدت ۱۰ دقیقه انتخاب شد.

الکترودهای استفاده شده در محیط کشت

با توجه به این‌که محیط کشت RPMI 1640 و همچنین سایر محیط کشت‌هایی که به‌منظور کشت پروماستیگوت استفاده می‌شود حاوی مقادیر زیادی آب و انواع نمک است، بنابراین از مفتول‌های طلا به‌عنوان الکترود استفاده شد که دارای بالاترین رسانایی، کمترین میزان تجزیه و کمترین مقدار گرمای تولید شده بود.

گروه‌های 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 پروماستیگوت‌ها در گروه‌های مختلف، از آزمون MTT (Microculture Tetrazolium Assay) استفاده شد. بدین ترتیب که در پلیت‌های ٤۸ خانه‌ای ۳۵۰ میکرولیتر محلول RPMI1640 و FCS ۱۰ درصد (Fetal Calf Serum) حاوی $۲×۱۰^{٦}$ پروماستیگوت به هر چاهک اضافه شد. سپس چاهک‌ها با اضافه کردن غلظت‌های مختلف نانو ذره یا تحت تأثیر قرار دادن با الکتریسته در گروه‌های مختلف آزمایش شد. یک چاهک نیز به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هر چاهک برداشته شد و به چاهک‌های میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای U شکل اضافه شد. میکروپلیت به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ٤۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع و دور ریخته شد به‌طوری که سلول‌ها در ته پلیت ته‌نشین شدند. پس از آن ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر RPMI و سپس ۱۰ میکرولیتر MTT به هر چاهک اضافه شد. پلیت به‌مدت ٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس پلیت به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ٤۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی به آرامی توسط سمپلر جمع و دور ریخته شد به‌طوری که سلول ها در ته پلیت ته‌نشین 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 به‌دست آوردن جذب نوری نمونه‌ها، از فرمول زیر درصد کشندگی محاسبه شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

درصد کشندگی=۱-[AT-AB]/[AC-AB]×100

AT جذب نوری نمونه، AB جذب نوری بلانک، AC جذب نوری شاهد.

روش انجام آزمون ممانعت از رشد پروماستیگوت‌ها IC_{50}

این آزمون بر پایه ممانعت یا مهار رشد تعداد مشخصی انگل زنده و فعال لیشمانیا ماژور به فرم پروماستیگوت (تعداد اولیه $۲×۱۰^{۶}$ پروماستیگوت) در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره ۲٤، ٤۸ و۷۲ ساعت پس از کشت انجام شد. ابتدا انگل‌های زنده و فعال لیشمانیا ماژور که به‌صورت فرم پروماستیگوت در محیط وجود دارند در روزهای متوالی شمارش شدند و هر موقع که تعداد انگل در هر میلی‌لیتر به $۲×۱۰^{۶}$ رسید تعداد انگل لازم برای مطالعه به‌دست آمده است.

پلیت‌های ۹٦ 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 ۲٦ درصد اضافه شد. بعد از این عمل، غلظت‌های مختلف نانو ذره به چاهک‌ها اضافه شد. لازم به ذکر است که تمام این آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شده است. علاوه بر این؛ یک پلیت به‌مدت ۲٤ ساعت، پلیت دوم به‌مدت ٤۸ ساعت و پلیت سوم به‌مدت۷۲ 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 به‌عنوان کنترل آزمون در نظر گرفته شد. پس از سپری شدن زمان‌های مورد نظر انگل‌ها شمارش شد و IC_{50} (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 of Variance) استفاده شد. همچنین برای تشخیص تفاوت‌های معنی‌دار به‌صورت دو به دو بین گروه‌های مختلف از آزمون T-test استفاده شد.

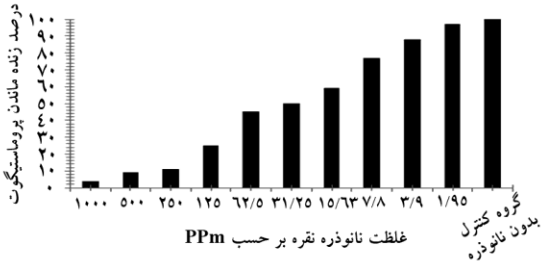
قابل ذکر است که از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (One- Sample Kolmogorov- Smirnov Test) برای بررسی فرض طبیعی بودن متغیرهای مورد بررسی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٦ استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

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

پس از گذشت ۲٤ 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> ۰/۰۵). ولی پس از گذشت ٤۸ 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< ۰/۰۵).

در شکل ۱ اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره نقره بر تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور پس از ٤۸ ساعت مواجهه نشان داده شده است.



شکل ۱ درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از ٤۸ ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

با استفاده از روش شمارش لام نئوبار مقدارIC50 با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism5 بعد از مدت زمان ۲٤ ساعت معنی‌دار نبود، اما بعد از مدت زمان ٤۸ ساعت مقدار IC50 برای پروماستیگوت‌ها مقدار ۳۹/۸ از غلظت نانو ذره نقره به‌دست آمد.

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

جریان مستقیم

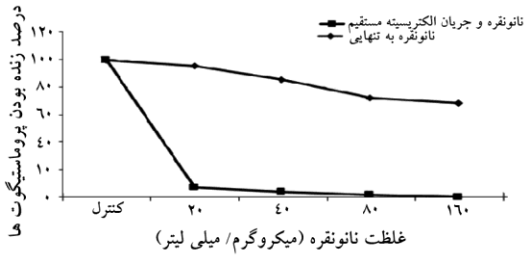
درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با جریان‌های مستقیم با آمپراژهای (۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۵ میلی‌آمپر) ۱۰ دقیقه پس از اعمال جریان با استفاده از روش شمارش تعداد انگل محاسبه شد. نتایج در جدول ۱ آمده است. طبق نتایج به‌دست آمده در جدول ۱، با افزایش آمپراژ جریان مستقیم الکتریسته، میزان مرگ و میر پروماستیگوت‌ها 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	٤۸/۲
۱/۵	٤٤/۸	۵۵/۲
۳	۳۳/۵	٦٦/۵
۵	۲۵/۵	۷٤/۵

نانو ذره نقره به تنهایی

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با نانو ذره نقره به تنهایی با غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ۸۰ و ۱٦۰ 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 است. به‌طوری که در اثر مواجهه پروماستیگوت‌ها با غلظت ۱٦۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره، ٦٦/۵ درصد آن‌ها زنده مانده‌اند.



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

جریان مستقیم و نانو ذره نقره

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده همزمان با جریان مستقیم ۳ میلی‌آمپر و نانو ذره نقره با غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ۸۰ و ۱٦۰ 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 ۱٦۰ 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 ٤۸ ساعت مواجهه بیشترین اثر ممانعت کنندگی از رشد انگل در غلظت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

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 [۱٤].

محبعلی 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 [۱٤].

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 پروماستیگوت ها ممانعت می‌کند. به‌طور 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 ٦/۵ برابر بود [۱۵].

در مورد استفاده از جریان الکتریکی برای مهار رشد میکروارگانیسم‌ها و بهبود زخم مطالعات متعددی انجام شده [۱٦-۲٤] ولی در رابطه با لیشمانیا مطالعه محدودی انجام شده است. حجازی و همکاران (۲۰۰٤) در بررسی تأثیر جریان مستقیم الکتریسته بر بقای لیشمانیا ماژور نشان دادند که ولتاژ ۳ دریافتی از منبع تغذیه به‌مدت ۳۵ دقیقه و ولتاژهای ٦، 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 [۲٤]. در مطالعه حاضر که بر مبنای جریان الکتریکی (میلی‌آمپر به جای ولتاژ) طراحی شده است جریان بسیار ضعیف ۳ میلی‌آمپری در ۱۰ دقیقه باعث مرگ و میر ٦٦/۵ درصد پروماستیگوت‌ها می‌شود. برای افزایش کارآیی 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 به‌شدت افزایش می‌یابد؛ به‌طوری که در غلظت ۱٦۰ میکرولیتر در میلی‌متر پس از ۱۰ دقیقه مصرف آن همراه با القای ۳ میلی‌آمپر جریان مستقیم الکتریسیته ۱۰۰ درصد پروماستیگوت‌ها از بین می‌رود. این در حالی است که مصرف این غلظت از نانو ذره به تنهایی پس از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

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 ٦٦/۵ درصد پروماستیگوت‌ها شد که این نشان دهنده اثر هم‌افزایی مصرف نانو نقره و الکتریسته در کشندگی پروماستیگوت‌ها است (P<۰/۰۵). 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 الکترود 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 الکترولیز طلا به ۱۰ آمپر الکتریسته نیاز است و جریان الکتریسته مورد استفاده در این مطالعه بسیار کم بود (۳ میلی‌آمپر)؛ بنابراین الکترولیز شدن فلز طلا و ورود آن به محیط کشت منتفی 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 جزیی (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 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 به‌شدت افزایش می‌یابد؛ به‌طوری که در غلظت ۱٦۰ میکرولیتر در میلی‌متر پس از ۱۰ دقیقه همراه با القای ۳ میلی‌آمپر جریان مستقیم الکتریسیته ۱۰۰ درصد پروماستیگوت‌ها از بین می‌روند.

تشکر و قدردانی

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

منابع

[1] Garcia, LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed., Washington, DC: ASM Press 2007.

[2] Grogl 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

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, Fakhar 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, Mohebali M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Edrissian GH, Esmaeili 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, Lifia J, Amal R. Reversible antimicrobial photoswitching in nanosilver. Small 2009; 5(3): 341-4.

[14] Mohebali M, Rezayat MM, Gilani K, Sarkar S, Akhoundi B, Esmaeili J, Satvat T, Elikaee 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 lieshmanial effect of nanosilver solutions on *Leishmania tropica* promastigotes by in 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]

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 parasiticidal effect of electricity on *Leishmania major*, both in vitro and in vivo. Ann Trop Med Parasitol 2004; 98(1): 37-42.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-25]