

مقاله اصلی

اثر مهاری الکتروپوریشن و نانوذرات نقره بر رشد پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور: تاثیر پهنای زمانی پالس

مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲

خلاصه

مقدمه

لیشمانیوز جلدی (CL) یک بیماری انگلی است که توسط گونه های مختلف از یک تک یاخته ای تازه کدار لیشمانیا از طریق پشه خاکی ماده از گونه فلوتوموس به انسان انتقال می یابد. در این مطالعه اثر پالسهای الکتریکی بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور در پهنای زمانی مختلف در حضور نانوذرات نقره مورد بررسی واقع شده است.

روش کار

نوع این مطالعه علوم پایه بوده که در پاییز سال ۱۳۹۰ در مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد واقع در پژوهشکده بوعلی انجام گرفت. ابتدا انگل لیشمانیا ماژور با سویه MRHO/IR/75/ER در محیط کشت RPMI 1640، در شرایط استاندارد کشت و سوسپانسیون پروماستیگوتهای با غلظت parasites/ml ۱۰^۶ ۴۰ تهیه و با نانوذرات نقره ای که بیشینه توزیع سائز آنها در ۶ نانومتر بود، در غلظتهای ۱۲ و ۲۴ میکرو مولار به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. سپس ۸ پالس الکتریکی توسط یک دستگاه الکتروپوریتور ECM 830 در چهار پهنای زمانی ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروثانیه با قدرت ۲۵۰۰ V/cm و فرکانس یک هرتز به نمونه ها اعمال شد. ۲۴ ساعت بعد درصد بقای پروماستیگوتهای در هر نمونه به روش MTS تعیین گردید.

نتایج

نتایج نشان داد افزایش پهنای زمانی پالس به تنهایی موجب نوساناتی در بقای پروماستیگوتهای شده که نسبت به یکدیگر معنی دار نبوده است. اما حضور نانوذرات نقره و اعمال همزمان پالسهای الکتریکی افت معنی داری در بقای پروماستیگوتهای فراهم می نماید. به نظر می رسد که همیاری پالسهای الکتریکی با نانوذرات نقره در غلظت ۲۴ میکرومولار با اعمال پالسهای با دیوریشن ۱۵۰ میکروثانیه و قدرت ۲۵۰۰ ولت برسانی متر، برای کاهش میزان تکثیر و بقای پروماستیگوتهای موفقیت آمیز بوده است ($p < 0.004$).

نتیجه گیری

حضور نانوذرات نقره و اعمال همزمان پالسهای الکتریکی افت معنی داری در کاهش بقای انگل فراهم می نماید.

کلمات کلیدی: الکتروپوریشن، پالس الکتریکی، پروماستیگوت، لیشمانیا ماژور، نانوذرات نقره

^۱ خدیجه مایلی فر

^۲ آمنه سازگارنیا*

^۳ ساجده یادگاری دهکردی

^۴ حسین عشقی

^۵ ندا عطاران

^۶ ثمانه سودمند

۳-۱- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشیار فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- دانشیار گروه شیمی، دانشگاه فردوسی

مشهد، مشهد، ایران

۵- دانشجوی دکتری شیمی، دانشگاه فردوسی

مشهد، مشهد، ایران

۶- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد، مشهد، ایران

*مشهد- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز

تحقیقات فیزیک پزشکی، مشهد، ایران

تلفن: ۹۸-۹۱۵۳۱۵۶۵۸۵+

email: sazgariniaA@mums.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یک بیماری انگلی است که توسط گونه های مختلف از یک تک یاخته ی تاژکدار لیشمانیا از طریق پشه خاکی ماده از گونه فلیبوتوموس به انسان انتقال می یابد.

براساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی در سطح جهان بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در مناطقی زندگی می کنند که امکان انتقال فعال این بیماری وجود دارد و تخمین زده می شود حدود ۱۴ میلیون نفر در آفریقا، آسیا، اروپا و آمریکا مستقیماً تحت تاثیر این بیماری قرار گیرند(۱).

در بیشتر نقاط دنیا مگلو مین آنتی مونات (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکانات (پنتوستام) به عنوان داروی انتخابی اول مصرف می شوند که در تزریق عضلانی عوارضی جدی مانند عوارض قلبی- کبدی و کلیوی... ایجاد می کند (۱). اما در سالهای اخیر اثربخشی این داروها کاهش چشمگیری داشته است (۲).

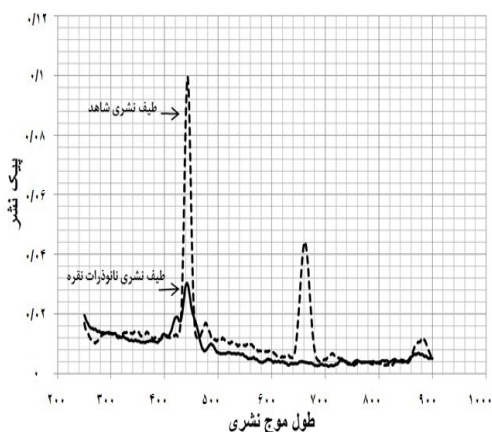
املاح نقره یکی از موادی است که به دلیل خواص آنتی باکتریال و ضد عفونی کنندگی قوی به طور گسترده ای در درمانهای میکروبی مورد بهره برداری قرار گرفته است (۳، ۴). در این راستا برخی از محققین ذرات نقره را در ابعاد بسیار کوچک در حد نانومتر پیشنهاد کرده اند تا با توجه به افزایش سطح و برخورداری از قدرت میکروب کشی چندین برابر جهت بهبود عفونتها از آن استفاده شود برخی مطالعات نیز اثر ضد لیشمانیایی نانوذرات نقره را بر لیشمانیا بررسی کرده و اثرات نسبتاً خوب ضد لیشمانیایی آن را نشان داده اند (۵). البته شایان ذکر است که با توجه به سمیت نانوذرات نقره برای بافتهای کبد، مغز و طحال و کاهش فولیکولهای تخمدانی، تجویز آن در دوزهای کم توصیه می شود (۶). بدین ترتیب استفاده از روشهای تحویل موضعی دارو می تواند دوز مورد نیاز را کاهش دهد.

الکتروپوریشن یکی از شیوه هایی است که به منظور انتقال مولکولها از میان غشاء سلولی مورد بهره برداری واقع شده است. در واقع ایجاد منفذ با اعمال میدان الکتریکی می تواند قابلیت نفوذپذیری پوست را نسبت به مواد و داروها گاه تا میزان ۱۰۰۰ برابر افزایش دهد (۷). در این روش با اعمال پالسهای الکتریکی نمایی یا مربعی کوتاه، منافذ موقتی در غشای سلول باز و مولکول مورد نظر وارد غشای سلول شده و مدتی پس از قطع

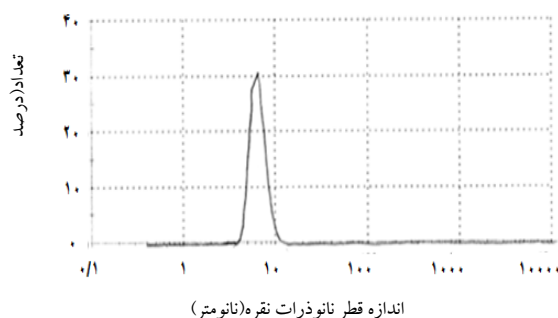
پالس این منافذ بسته می شود. در حال حاضر از این روش برای مقاصد ژن درمانی، الکتروشیمی درمانی و... استفاده می شود. اما تا کنون جهت مقابله با لیشمانیا به کار گرفته نشده است. در تحقیق حاضر تاثیر همزمان نانوذرات نقره و الکتروپوریشن بر پروماستیگوتهاى انگل لیشمانیا مورد مطالعه واقع شده است. البته تاثیر تحریک الکتریکی بر باکتری زدایی مثبت گزارش شده است. بر اساس این تحقیقات انتخاب الکتروود آند از جنس نقره توانسته است در مواردی بر باکتری های گرم منفی اثر باکتری زدایی و نسبت به باکتری های گرم مثبت اثر مهارى داشته باشند (۸). تحریک الکتریکی به عنوان روش درمان در تعدادی از بیماریها از جمله، تومورهای خوش خیم و بدخیم، اسکارهای هیپرتروفیک و پارکینسون نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۹-۱۱). همچنین استفاده از تحریکات الکتریکی با پهنای زمانی کوتاه و در فرکانسهای بالاتر در کاربردهای انسانی امن بوده و بدون ایجاد حس برق گرفتگی همراه با کمترین انقباض عضلانی یا عوارض گزارش شده است (۱۲).

روش کار

نوع این مطالعه علوم پایه بوده که در پاییز سال ۱۳۹۰ در مرکز تحقیقات فیزیکی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد واقع در پژوهشکده بوعلی انجام گرفت، تلاش بر آن بوده که در یک درمان ترکیبی اثر پالسهای الکتریکی در حضور نانوذرات نقره بر روی انگل لیشمانیا ماژور بر میزان تحریک یا بازدارندگی از رشد و تکثیر پروماستیگوتها مورد بررسی قرار گیرد. تهیه و آماده سازی پروماستیگوتها بدین صورت بوده که در مرحله اول: کشت آماستیگوت های استخراج شده از طحال موشها در محیط آگار خون دار (N.N.N)، انجام شد. ابتدا موشهای مبتلا به لیشمانیوز که زخم آنها احشایی شده کشته و طحال برداری گردید. سپس طحال کاملاً کوبیده شده را در محیط آگار خون دار و محیط کشت RPMI 1640 (GIBCO) حاوی $100 \mu\text{g/ml}$ پنی سیلین، $100 \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین، به انضمام ۲۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) خریداری شده از شرکت GIBCO آمریکا در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد مدت دو هفته کشت داده شد تا آماستیگوتهاى موجود در سلولهای طحال به پروماستیگوت تبدیل



شکل ۱- طیف نشری نانوذرات نقره پس از تحریک نمونه در ۲۵۰ نانومتر



شکل ۲- میانگین توزیع سایز نانوذرات نقره حدود ۶ نانومتر



شکل ۳- اعمال پالس به سوسپانسیون انگل و نانوذرات نقره با دستگاه الکتروپوریتور مدل ECM-830 ساخت شرکت جیترونیکس امریکا صورت گرفت

تولید و اعمال پالسهای الکتریکی به نمونه های انگل توسط یک دستگاه مولد پالس مربعی مدل ECM-830 ساخت شرکت جیترونیکس امریکا در کووت های استریل یک بار مصرف با

شوند. مرحله دوم: کشت پروماستیگوتها در محیط RPMI-1640 است. پروماستیگوتهای لیثمانیا ماژور را در محیط کشت حاوی $100 \mu\text{g/ml}$ پنی سیلین، $100 \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین، به انضمام ۱۰٪ (FCS) در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شد. به منظور پاساژ دادن انگل، سوسپانسیون در سانتریفیوژ یخچال دار به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ بر دقیقه ته نشین و محیط کشت رویی آن خارج گردید. انگل ها بعد از ۶ روز انکوباسیون به فاز رشد ثابت (stationary-phase) می رسند که برای انجام مطالعه مناسب خواهد بود (۱۳). با استفاده از لام نئوبار تعداد پروماستیگوتها زیر میکروسکوپ نوری شمارش و سوسپانسیونی با غلظت $10^6 \text{ parasites/ml}$ ۴۰ تهیه شد. در این مطالعه از نانوذرات نقره با سایز ۶ نانومتر که توسط گروه شیمی دانشگاه فردوسی مشهد تولید شده بود، استفاده شد. بدین منظور ۳۰ میلی لیتر بروهیدریدسدیم (NaBH_4) 0.002 مولار را به ارلن مایر اضافه کرده سپس با گذاشتن یک مگنت درون ارلن، به مدت ۲۰ دقیقه در حمام یخ و روی پلیت متحرک قرار داده شد. در همین وضعیت ۲ میلی لیتر نیترات نقره (AgNO_3) 0.001 مولار به محلول اضافه شد (در هر ثانیه ۱ قطره چکانده شد). برای ممانعت از aggregate شدن به مقدار کافی (PVA) polyvinyl alcohol اضافه شد (۱۴). روشهای تعیین مشخصات نانوذرات نقره به این ترتیب است، طیف سنجی: طیف جذبی نانوذرات نقره در آب در محدوده طول موجهای ۲۰۰ تا ۷۵۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر نور مرئی ماوراء بنفش شیمادزو مدل UV1700 به دست آمد. بالاترین قله ی جذب در طول موج ۴۰۶ نانومتر ثبت گردید.

بررسی طیف فلورسانس نشری نانوذرات نقره پراکنده شده در آب به روش فلورومتری (دستگاه فلورومتر FP-6200 ساخت کمپانی Shimadzu) انجام گرفت. طول موج تحریک ۲۵۰ نانومتر تعیین گردید و بالاترین قله نشر در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت گردید (شکل ۱). چگونگی توزیع سایز نانوذرات با استفاده از دستگاه آنالیزکننده سایز ذرات (Malvern Instruments, Southborough, MA) مورد مطالعه قرار گرفت و بیشترین فراوانی نانوذرات در قطر ۶ نانومتر تعیین گردید (شکل ۲).

جدول ۱- شرايط گروههاى درمانى مورد تحقيق

سرى	نانوذرات نقره (ميكرومولار)	اعمال پالس الكتريكى
كنترل	صفر	-
۱	صفر	+
۲	۱۲	-
۳	۱۲	+
۴	۲۴	-
۵	۲۴	+

آزمایشات بر سه گروه سلولى با غلظت متفاوت از نانوذرات نقره، گروه كنترل (غلظت نانوذرات صفر)، و دو گروه جداگانه با غلظتهاى ۲۴ و ۱۲ ميكرومولار از نانوذرات نقره انجام گرفت كه براى هر کدام اين گروهها در زير گروههاى مختلف، شرايط متفاوتى از پالسهاى الكتريكى در قالب ۸ پالس در قدرت ۲۵۰۰ ولت بر سانتى متر و پنهاى زمانى مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ ميكروثانيه در حضور و بدون حضور نانوذرات نقره اعمال شد. بعد از اعمال پالس ها و گذشت ۲۴ ساعت انكوباسيون انگل و نانوذرات نقره، بروش MTS، درصد بقاى انگلها تعيين و محاسبه گرديد. براى اطمينان از نتايج، هر آزمایش چهار بار تكرر شد. در نهايت، تجزيه و تحليل داده ها توسط نرم افزار آمارى SPSS انجام گرفت. جهت مقايسه داده ها با توجه به تبعية آنها از توزيع طبيعى، از آزمونهاى آناليز واريانس يك طرفه و توكى بهره گيرى شد.

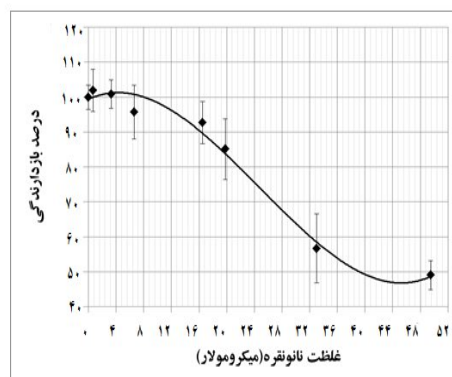
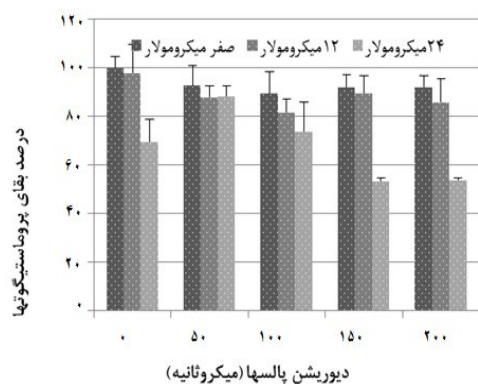
نتايج

در بخش اول سميت نانوذرات نقره تعيين شد و بر اساس نتايج نشان داده شده در نمودار (۱)، غلظتى از نانوذرات نقره كه مى تواند ۵۰٪ پروماستيگوتها را از بين ببرد، ۳۹/۲ ميكرومولار به دست آمد. در بخش دوم اثر پالسهاى الكتريكى به تنهائى و در حضور نانوذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. نتايج نشان داد افزايش پنهاى زمانى پالس بتنهائى موجب نوساناتى در بقاى پروماستيگوتها شده كه نسبت به يكديگر معنى دار نبوده است ($p > 0/66$). البته حضور نانوذرات نقره و اعمال همزمان پالسهاى الكتريكى افت معنى دارى در كاهش بقاى انگل فراهم مى نمايد ($p < 0/005$).

قطر حفره ۲ ميلى متر انجام گرفت (شكل ۳). سنجش بقاى پروماستيگوت ها به روش MTS Cell roliferation Assay، براى ارزيابى اثرات نانوذرات نقره و تاثير پالسهاى الكتريكى با پنهاى زمانى مختلف بر رشد و تكثير پروماستيگوتهاى ليشمانيا ماژور از روش MTS Cell Proliferation Assay استفاده شد كه به عنوان شاخص رشد و زنده بودن پروماستيگوت در برابر پاسخ دارويى به كار مى رود. MTS با مشخصات (promega; cat No.G5421) وارد ميتوكندرى سلولها و يا انگل زنده شده، آنزيم دهيدروژناز داخل ميتوكندرى، MTS را احيا کرده و به فورمازان تبديل مى كند، فورمازان درون سلول تجمع پيدا کرده و در PMS حل مى شود (۱۵). جذب نوري ناشى از تغيير رنگ ايجاد شده توسط دستگاه الايزا ريدر (Awareness 14; model 3200) در طول موج ۴۹۲ نانومتر مورد سنجش قرار مى گيرد.

آزمایشات طراحي شده، بخش اول: تعيين IC_{50} نانوذرات نقره در اين مرحله، غلظت هاى مختلف نانوذرات نقره بدون اعمال پالس الكتريكى با انگل انكوبه شد تا غلظتى از نانوذرات نقره كه مى تواند به ميزان ۵۰٪ از رشد و تكثير انگل جلوگيرى كند IC_{50} (inhibitory concentration 50%) به دست آيد. بخش دوم: بررسى اثر پالسهاى الكتريكى در حضور و غياب نانوذرات نقره بر بقاى پروماستيگوتها، ابتدا سوسپانسيون پروماستيگوت با غلظت 10^6 parasites/ml تهيه گرديد، سپس سوسپانسيون پروماستيگوت با نانوذرات نقره به مدت ۶۰ دقيقه انكوبه و بعد از اعمال پالس هاى الكتريكى به نمونه ها پروماستيگوتها به مدت ۲۴ ساعت در انكوباتور ۲۸ درجه انكوبه شدند، به منظور سنجش ميزان تكثير انگل از روش MTS استفاده شد و درصد بقاى نمونه ها در مقايسه با گروه كنترل محاسبه شد.

شرايط درمانى پروماستيگوت ها در چهار گروه آزمایشى مطابق جدول ۱ اجرا و اهداف زير مورد مطالعه قرار گرفت.



نمودار ۱- سمیت ناشی از نانوذرات نقره روی انگل بدون اعمال

پالس الکتریکی. غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره بر حسب میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت با انگل انکوبه گردید، هر آزمایش ۴ بار تکرار و داده‌ها بیانگر میانگین \pm انحراف معیار داده‌هاست.

آزمایشات بر پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۱۲ به ۲۴ میکرومولار ضمن اعمال پالسهای الکتریکی با دیوریشن ۱۵۰ میکروثانیه باعث افت معنی دار در بقای پروماستیگوت‌ها شده است ($p < 0/001$). غلظت ۲۴ میکرومولار نانوذرات نقره نسبت به گروه مشابه بدون آن (از نظر دریافت پالس) معنی دار بوده ($p < 0/001$)، اما هیچ تفاوت معنی داری بین گروه‌های با غلظت صفر (کنترل) و ۱۲ میکرومولار مشاهده نشد.

همچنین افزایش پهنای زمانی از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروثانیه تغییر معنی داری در بقای پروماستیگوت‌ها در حضور ۲۴ میکرومولار از نانوذرات فراهم کرده است ($p < 0/004$).

در غلظت ۱۲ میکرومولار از نانو نقره نیز با اعمال پالسهای با پهنای زمانی ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروثانیه تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شده است ($p < 0/004$).

این در حالی است که برای گروه بدون دارو، افزایش پهنای زمانی پالسها باعث نوساناتی در بقا و تکثیر پروماستیگوت‌ها شده که نسبت به یکدیگر معنی دار نبوده است.

نمودار ۲- اثر پهنای زمانی پالس روی میزان تکثیر و بقای پروماستیگوت‌ها. ولتاژ ۵۰۰ ولت، قدرت پالس ۲۵۰۰ ولت بر سانتی متر، تعداد پالس ۸، فرکانس ۱ هرترتز، در دیوریشن‌های زمانی مختلف بر حسب میکروثانیه برای ۳ غلظت صفر، ۱۲ و ۲۴ میکرومولار از نانوذرات نقره نشان داده شده است، هر آزمایش ۴ بار تکرار گردیده و داده‌ها بیانگر میانگین \pm انحراف معیار داده‌هاست.

بحث

طبق مطالعه‌ی حاضر به نظر می‌رسد که همبندی پالسهای الکتریکی با نانو ذرات نقره در غلظت ۲۴ میکرومولار با اعمال پالسهای با دیوریشن ۱۵۰ میکروثانیه، قدرت ۲۵۰۰ ولت بر سانتی متر و تعداد ۸ پالس، برای افزایش میزان کشندگی پروماستیگوت‌ها موفقیت آمیز بوده ($p < 0/004$)، ولی افزایش پهنای زمانی پالس به تنهایی اثر کشندگی معنی داری بر انگل لیثمانیا ماژور نداشته است.

از جمله نقاط قوت این مطالعه می‌توان به اعمال پالسهای الکتریکی با پهنای زمانی کوتاه در حد میکروثانیه، که در کاربردهای انسانی امن و بدون ایجاد حس برق گرفتگی است، همچنین استفاده از ذرات نقره در ابعاد نانو، که uptake درون سلولی را افزایش می‌دهد، اشاره کرد. ضمناً با فراهم آمدن امکان کاهش دوز نانوذرات نقره مورد نیاز، کاهش عوارض جانبی سیستمیک نانوذرات نقره در درمان حاصل می‌شود و بالاخره فراهم آمدن امکان اجرای درمانهای موضعی را نیز نباید نادیده گرفت. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد که کاربرد پالسهای

الكترىكى با زمان کوتاه در حد ميكروثانيه توانسته تعدادى منفذ موقتى در غشای پروماستيگوتها ايجاد كند و اين موجب ورود نانوذرات نقره ي بيشترى به داخل پروماستيگوت شده و با ايجاد سميت، موجبات مرگ پروماستيگوتها را فراهم كند. با توجه به عدم تفاوت معنى دار بين گروههاى بدون نانوذرات نقره و دريافت كننده پالس به نظر مى رسد پالسهاى الكترىكى با شرايط اعمال شده همچگونه تاثير تخريبيى دائمي بر غشای پروماستيگوتها نداشته است بنا بر اين مى توان نتيجه گرفت اثر پالس گذرا و موقتى بوده است، هر چند كه افزايش ديوريشن مى توانسته منجر به افزايش سايز منافذ در غشای سلولى يا باكتريايى شود.

با توجه به آنكه از قدرت ۲۵۰۰ ولت بر سانتي متر و ديوريشن ۱۰۰ ميكروثانيه به بعد افت چشمگيرى در درصد بقاى پروماستيگوتها ظاهر شده به نظر مى رسد ابعاد منافذ غشا با دريافت پالسهاى با پهنای زمانى ۱۵۰ ميكروثانيه، بحدى افزايش يافته كه با ورود بيشتر نانوذرات نقره نتيجه مذكور به دست آمده است.

افزايش ديوريشن از ۱۵۰ به ۲۰۰ ميكروثانيه تغيير معنى دارى بر کاهش درصد بقاى پروماستيگوتها ايجاد نكرده است. در شرايط اين تحقيق به نظر مى رسد حتى ديوريشن ۱۵۰ ميكروثانيه براى ايجاد مرگ سلولى مناسب باشد. از آنجا كه تا كنون تحقيقى مبنى بر درمان تركيبى الكتروپوريشن و نانوذرات نقره بر انگل ليشمانيا گزارش نشده است، به بررسى مطالعاتى پرداخته مى شود كه اثر الكتروپوريشن را بر DNA و يا بعضى رده هاى سلولى بررسى كرده اند.

در مطالعه گلبيرگ^۱ (۲۰۱۰) اثر پارامترهاى مختلف الكتروپوريشن بر DNA سلول بررسى شده است (۱۶). وي از قدرت ميدان الكترىكى ۵۰۰ ولت بر سانتي متر، تعداد پالس ۸ تا، فرکانس ۱هرتز و پهنای زمانى مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰) ميلي ثانيه يعنى شرايط بينابى الكتروپوريشن برگشت پذير و غيرقابل برگشت براى افزايش نفوذپذيرى پوست و جهت تحويل دارو و واكسن DNA استفاده كرده است و نشان داد كه بدین

ترتيب يك ارتباط قوى بين ديوريشن زمانى پالسها و تغييرات در DNA وجود دارد.

با مقايسه ي مطالعه بالا و تحقيق حاضر به نظر مى رسد كه هر چه ديوريشن زمانى طولانى تر انتخاب شود بايد قدرت ميدان الكترىكى اعمالى پايينتر باشد تا برگشت پذير بودن الكتروپوريشن احراز شود. شايد بتوان گفت ايجاد تاثير بر DNA مستلزم ايجاد تغيير برگشت ناپذير در غشا نيست (۱۶).

در مطالعه آنتو^۲ در سال ۲۰۰۴ اثر الكتروپوريشن بر تراوايى غشا دوره سلولى در حضور BSA-FITC در ولتاژهاى ۲/۵ تا ۲۰ ولت بر سانتي متر و پهنای زمانى ۱۸۰ ميكروثانيه موفقيت آميز گزارش كرد (۱۷). كه در مقايسه با مطالعه ي حاضر از نظر ولتاژ با اعمال قدرت كمترى به نتيجه ي مطلوب رسيده است. دليل اين اختلاف مى تواند مربوط به اندازه پروماستيگوتها (در ابعاد خيلى كوچكتر در حدود ۱۴-۲۰ ميكرون طول و ۴-۱/۵ ميكرون عرض) و احتمالاً ولتاژ غشای آنها باشد كه مقاومت بيشترى در برابر تخریب غشای سلولى و همچنين الكتروپوريشن از خود نشان مى دهند. رايج ترين نظريه، جهت غير فعال كردن ميكروبيها استفاده از الكتروپوريشن شديد (يعنى شكل گيرى منافذ با پالس هاى الكترىكى ولتاژ بالا) است كه باعث ناپايدارى محلى در غشای ميكرو ارگانيسم تحت درمان با پالس الكترىكى و در نتيجه غير فعال كردن ميكروبيها مى شود (۱۸). مطالعات بسيارى نشان داده اند كه براى غير فعال كردن ميكرو ارگانيسم ها (استريليزاسيون در مقياس آزمایشگاهی)، پالس هاى الكترىكى با شدت بالاتر از ۳۰ كيلو ولت بر سانتي متر و ديوريشن هاى بالاتر از ۱۰۰ ميكروثانيه لازم است (۱۹). اين در حالى است كه در شرايط مطالعه ي حاضر از قدرت ۲/۵ كيلو ولت بر سانتي متر و ديوريشن ۱۵۰ ميكروثانيه جهت تراوا كردن غشای انگل ليشمانيا نسبت به نانوذرات نقره بهره گرفته شده است.

سايز نانوذرات، مساحت سطح و سطح عامل دار يكي از عوامل اصلى تاثير بريوكينتيك و سميت آنها به شمار مى رود (۲۰).
مكانيسمهاى احتمالى تاثير نانوذرات نقره را مى توان به صورتهای زير پيش بينى نمود:

²Antov

¹Golberg

نانوذرات نقره با سایز کوچک و سطح زیاد در دسترس و توانایی اتصال به گروههای سولفور و فسفر می توانند اثرات ضد لیشمانیایی را افزایش دهند (۲۱). همچنین نانوذرات نقره از طریق آزاد کردن یون نقره دارای ظرفیت تولید بالایی از رادیکالهای آزاد اکسیژن هستند که انگل لیشمانیا نسبت به آن آسیب پذیر شناخته شده است (۲۱). اثر قطعی نانوذرات نقره بر فعالیت متابولیکی انگل لیشمانیا در دو فاز پروماستیگوت. آماستیگوت در مطالعاتی نظیر (Allahverdiyev سال ۲۰۱۱) و (Mohebbali سال ۲۰۰۹) منتشر گردیده است (۲۱، ۱۳). مشاهده شده که آسیب ساختاری و عملکردی میتوکنندری باعث مهار فعالیت متابولیک می شود و بدنبال آن کاهش عملکرد ATP رخ می دهد. بر اساس نظر آشارانی^۱ (۲۰۰۹) کم شدن ATP و یا فعالیت میتوکنندری که می تواند منجر به مهار متابولیک در سلول شود، همیشه نشان دهنده مرگ سلولی نیست (۲۰). از آنجا که در این تحقیق نیز آزمون سنجش بقای پروماستیگوتها بر مبنای فعالیت میتوکنندری عمل کرده است، پیشنهاد می شود در تحقیق بعدی پروماستیگوتهای درمان شده به مدل حیوانی موشی تزریق زیرجلدی گردد و در صورت عدم ایجاد ضایعه مرگ پروماستیگوتها تایید گردد، همچنین به منظور بررسی تاثیر درمان

مذکور در شرایط درون تنی بر بیماری جلدی لیشمانیازیس ضروریست ابتدا اثر آن بر آماستیگوتها نیز مورد ارزیابی قرار گیرد و در نتیجه مشاهده نتایج مطلوب، فاز بعدی مطالعه بر مدل حیوانی لیشمانیوز انجام شود. از آنجا که از الکتروپوریشن در کاربردهای بالینی برای تحویل DNA به صورت موضعی به پوست استفاده شده است، در صورت تایید اثر درمانی موثر نانوذرات نقره و پالسههای الکتریکی کوتاه در فازهای بعدی مطالعه، به نظر می رسد بتوان در درمان لیشمانیوز جلدی از دوز پائینی از نانوذرات نقره بصورت موضعی بهره جست.

نتیجه گیری

حضور نانوذرات نقره در غلظت پائین که فاقد سمیت کبدی است با اعمال همزمان پالسههای الکتریکی افت معنی داری در درصد بقای پروماستیگوتها فراهم می نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کمیته تحقیقات دانشجویی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل تامین اعتبار هزینه اجرای این طرح به شماره ۹۰۳۱۴ قدردانی می شود.

References:

1. Igbineweka O, Aghedo F, Idusuyi O, Hussain N. Evaluating the efficacy of topical silver nitrate and intramuscular antimonial drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Sokoto, Nigeria. *Afr J Clin Exp Microbiol* 2012; 13:90-97.
2. Sazgarnia A, Taheri AR, Soudmand S, Parizi AJ, Rajabi O, Darbandi MS. Antiparasitic effects of gold nanoparticles with microwave radiation on promastigots and amastigotes of *Leishmania major*. *Int J Hyperthermia* 2013; 29:79-86. Epub 2013/01/15.
3. Kvítek L, Panacek A, Prucek R, Soukupova J, Vanickova M, Kolar M, *et al.* editors. Antibacterial activity and toxicity of silver–nanosilver versus ionic silver. IOP Publishing; 2011.
4. Shameli K, Ahmad MB, Yunus WZ, Ibrahim NA, Darroudi M. Synthesis and characterization of silver/talc nanocomposites using the wet chemical reduction method. *Int J Nanomed* 2010; 5:743-751. Epub 2010/11/03.
5. 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. 2011. 2011; 13:8-12.
6. Ghorbanzadeh V, Moshtaghian SJ, Habibian S, Ebadi AG. Influence of nano-silver on graffian follicles via intraperitoneal injection in rats. *Middle-East J Sci Res* 2011; 8:228-230.
7. Sazgarnia A BTM, Valizadeh M, Homaei F, Esmaily H. Relative Electroporability and electric pulse effectiveness in human breast adenocarcinoma: an *in vitro* study. *Iran J Basic Med Sci* 2008; 11:97-103.
8. Hedayati R, Karimi N. *Electrotherapy: University of Social Welfare And Rehabilitation Sciences*; 2010; 304-305
9. Nilsson E, von Euler H, Berendson J, Thorne A, Wersall P, Naslund I, *et al.* Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry* 2000; 51:1-11. Epub 2000/05/03.
10. Weiss DS, Eaglstein WH, Falanga V. Exogenous electric current can reduce the formation of hypertrophic scars. *J Dermatol Surg Oncol* 1989; 15:1272-1275. Epub 1989/12/01.
11. Davis KD, Taub E, Houle S, Lang AE, Dostrovsky JO, Tasker RR, *et al.* Globus pallidus stimulation activates the cortical motor system during alleviation of parkinsonian symptoms. *Nat Med* 1997; 3:671-674.
12. Shankayi Z, Firoozabadi SM. Tumor growth inhibited by low-voltage amplitude and 5-kHz frequency electrochemotherapy. *J Membrane Biol* 2011; 244:121-128. Epub 2011/11/08.
13. Mohebal M, Gilani K, Sarkar S, Akhoundi B, Esmaili J, Satvat T, *et al.* Nanosilver in the treatment of localized Cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania major*: an *in vitro* and *in vivo* study. *Tehran Univ Med Sci Grant* 2009; 4:285-289.
14. Baiocco P, Ilari A, Ceci P, Orsini S, Gramiccia M, Di Muccio T, *et al.* Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. *ACS Med Chem Lett* 2011; 2(3): 230–233
15. Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *J Microbiol Methods* 2006; 66:79-86.
16. Golberg A, Rubinsky B. The effect of electroporation type pulsed electric fields on DNA in aqueous solution. *Technol Cancer Res Treat* 2010; 9:423-430.
17. Antov Y, Barbul A, Korenstein R. Electroendocytosis: stimulation of adsorptive and fluid-phase uptake by pulsed low electric fields. *Exp Cell Res* 2004; 297:348-362.
18. Rowan NJ, MacGregor SJ, Anderson JG, Fouracre RA, Farish O. Pulsed electric field inactivation of diarrhoeagenic *Bacillus cereus* through irreversible electroporation. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31:110-114. Epub 2000/06/09.
19. Saldana G, Puertolas E, Monfort S, Raso J, Alvarez I. Defining treatment conditions for pulsed electric field pasteurization of apple juice. *Int J Food Microbiol* 2011; 151:29-35. Epub 2011/09/02.
20. AshaRani P, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2008; 3:279-290.
21. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, *et al.* Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *Int J Nanomedicine* 2011; 6:2705-2714.