مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ٥٦، شماره٤
مهر- آبان ٩٢ ، صفحه ٢٤٧-٢٥٤

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 56, No. 4 P: 247-254
Sep-Oct 2013

مقاله اصلی

# اثر مهاری الکتروپوریشن و نانوذرات نقره بر رشد پروماستیگوتهای لیشمانیاماژور: تاثیر پهنای زمانی پالس

مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۲/٦/۲

## خلاصه

**مقدمه**

لیشمانیوز جلدی (CL) یک بیماری انگلی است که توسط گونه های مختلف از یک تک یاخته ای تاژکدار لیشمانیا از طریق پشه خاکی ماده از گونه فلبوتوموس 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 ۱۳۹۰در مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد واقع در پژوهشکده بوعلی انجام گرفت. ابتدا انگل لیشمانیا ماژور با سویه MRHO/IR/75/ERدر محیط کشت RPMI 1640 ، در شرایط استاندارد کشت و سوسپانسیون پروماستیگوتها با غلظت parasites/ $10^6$ml ۴۰ تهیه و با نانوذرات نقره ای که بیشینه توزیع سایز آنها در ۶ نانومتر بود، در غلظتهای ۲۴و۱۲ میکرو مولار به مدت ۱ساعت 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 پروماستیگوتها در هر نمونه به روش MTS تعیین گردید.

**نتایج**

نتایج نشان داد افزایش پهنای زمانی پالس به تنهایی موجب نوساناتی در بقای پروماستیگوتها شده که نسبت به یکدیگر معنی دار نبوده است. اما حضور نانوذرات نقره و اعمال همزمان پالسهای الکتریکی افت معنی داری در بقای پروماستیگوتها 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 برسانتی متر، برای کاهش میزان تکثیر و بقای پروماستیگوتها موفقیت آمیز بوده است ($p<۰/۰۰۴$).

**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

[1] خدیجه مایلی فر
[2] آمنه سازگارنیا*
[3] ساجده یادگاری دهکردی
[4] حسین عشقی
[5] ندا عطاران
[6] ثمانه سودمند

۱،۳- 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 دکترای 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:۰۹۱۵۳۱۵۶۵۸۵-۹۸+
email:sazgarniaA@mums.ac.ir

Archive of SID
www.SID.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 فلبوتوموس 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 مستقیما تحت تاثیر این بیماری قرار گیرند(۱).

در بیشتر نقاط دنیا مگلومین 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 ضدعفونی 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 دوز های کم توصیه می شود (۶). بدین ترتیب استفاده از روشهای تحویل موضعی دارو می تواند دوز مورد نیاز را کاهش دهد.

الکتروپوریشن یکی ازشیوه 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 ۱۰۰۰برابر افزایش دهد (۷). دراین روش با اعمال پالسهای الکتریکی نمایی یا مربعی کوتاه، منافذ موقتی در غشای سلول باز و مولکول مورد نظر وارد غشا ی 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 پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا مورد مطالعه واقع شده است. البته تاثیر تحریک الکتریکی بر باکتری زدایی مثبت گزارش شده است. بر اساس این تحقیقات انتخاب الکترود آند از جنس نقره توانسته است در مواردی بر باکتری های گرم منفی اثر باکتری زدایی و نسبت به باکتری های گرم مثبت اثر مهاری 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

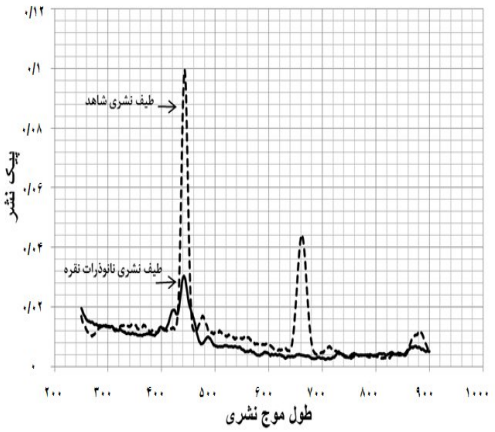
نوع این مطالعه علوم پایه بوده که در پاییز سال ۱۳۹۰در مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد واقع در پژوهشکده بوعلی انجام گرفت، تلاش بر آن بوده که در یک درمان ترکیبی اثر پالسهای الکتریکی در حضور نانوذرات نقره بر روی انگل لیشمانیا ماژور بر میزان تحریک یا بازدارندگی از رشد و تکثیر پروماستیگوتها 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 کاملا کوبیده شده را در محیط آگار خون دار و محیط کشت RPMI 1640 (GIBCO) حاوی 100 µg/ml پنی سیلین، 100 µg/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 آماستیگوتهای موجود در سلولهای طحال به پروماستیگوت تبدیل

Archive of SID

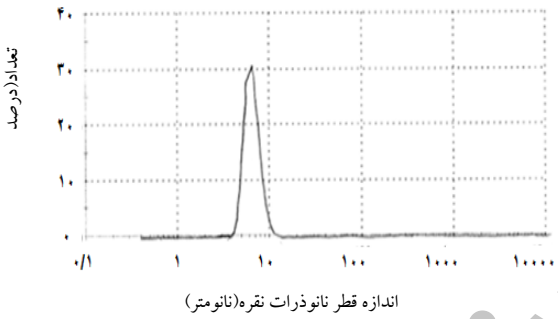
www.SID.ir

شوند. مرحله دوم: کشت پروماستیگوتها در محیط RPMI-1640 است. پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور را در محیط کشت حاوی ۱۰۰ µg/ml پنی سیلین، ۱۰۰ µg/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 ۱۰دقیقه 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 $10^6$ 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 ($NaBH_4$) ۰/۰۰۲ مولار را به ارلن مایر اضافه کرده سپس با گذاشتن یک مگنت درون ارلن، به مدت ۲۰دقیقه در حمام یخ و روی پلیت متحرک قرار داده شد. در همین وضعیت ۲ میلی لیتر نیترات نقره($AgNO_3$) ۰/۰۰۱ مولار به محلول اضافه شد (در هرثانیه ۱قطره 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 اسپکتروفتومتر نور مرئی ماوراء بنفش شیمادزو مدل UV1700 به دست آمد. بالاترین قله ی جذب در طول موج ۴۰۶ نانومتر ثبت گردید.

بررسی طیف فلوئورسانس نشری نانوذرات نقره پراکنده شده درآب به روش فلوئوریمتری (دستگاه فلوئوریمتر FP-6200ساخت کمپانی Shimadzo) انجام گرفت. طول موج تحریک ۲۵۰ نانومتر تعیین گردید و بالاترین قله نشر در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت گردید (شکل۱). 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 (شکل۲).




**شکل۱**– طیف نشری نانوذرات نقره پس از تحریک نمونه در ۲۵۰ نانومتر




**شکل۲**– میانگین توزیع سایز نانوذرات نقره حدود ۶ نانومتر

**شکل۳**–اعمال پالس به سوسپانسیون انگل و نانوذرات نقره با دستگاه الکتروپوریتور مدلECM-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

Archive of SID
www.SID.ir

قطر حفره ۲ میلی متر انجام گرفت (شکل۳). سنجش بقای پروماستیگوت ها به روش MTS Cell roliferation Assay، برای ارزیابی اثرات نانوذرات نقره و تاثیر پالسهای الکتریکی با پهنای زمانی مختلف بر رشد و تکثیر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور از روش MTS Cell Proliferation Assay استفاده شد که به عنوان شاخص رشد و زنده بودن پروماستیگوت در برابر پاسخ دارویی به کار می رود. MTS با مشخصات (promega; cat No.G5421) وارد میتوکندری سلولها و یا انگل زنده شده، آنزیم دهیدروژناز داخل میتوکندری، MTS را احیا کرده و به فورمازان تبدیل می کند، فورمازان درون سلول تجمع پیدا کرده و در PMS حل می شود (۱۵). جذب نوری ناشی از تغییر رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الایزاریدر(Awareness 14; model 3200) در طول موج ۴۹۲ نانومتر مورد سنجش قرار می گیرد.

آزمایشات طراحی شده، بخش اول: تعیین $IC_{50}$ نانوذرات نقره ( inhibitory concentration 50%) $IC_{50}$

در این مرحله، غلظت های مختلف نانوذرات نقره بدون اعمال پالس الکتریکی با انگل انکوبه شد تا غلظتی از نانوذرات نقره که می تواند به میزان۵۰٪ از رشد و تکثیر انگل جلوگیری کند (inhibitory concentration 50%) $IC_{50}$ به دست آید.

بخش دوم: بررسی اثر پالسهای الکتریکی در حضور و غیاب نانوذرات نقره بر بقای پروماستیگوتها، ابتدا سوسپانسیون پروماستیگوت با غلظت $10^6$ ۴۰ parasites/ml تهیه گردید، سپس سوسپانسیون پروماستیگوت با نانوذرات نقره به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه و بعد از اعمال پالس های الکتریکی به نمونه ها پروماستیگوتها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور۲۸ درجه انکوبه شدند، به منظور سنجش میزان تکثیر انگل از روش MTS استفاده شد و درصد بقای نمونه ها در مقایسه با گروه کنترل محاسبه شد.

شرایط درمانی پروماستیگوت ها در چهار گروه آزمایشی مطابق جدول۱ اجرا و اهداف زیر مورد مطالعه قرار گرفت.

**جدول۱**- شرایط گروههای درمانی مورد تحقیق

| اعمال پالس الکتریکی | نانوذرات نقره(میکرومولار) | سری |
|---|---|---|
| - | صفر | کنترل |
| + | صفر | ۱ |
| - | ۱۲ | ۲ |
| + | ۱۲ | ۳ |
| - | ۲۴ | ۴ |
| + | ۲۴ | ۵ |

آزمایشات بر سه گروه سلولی با غلظت متفاوت از نانوذرات نقره، گروه کنترل (غلظت نانوذرات صفر) ، و دو گروه جداگانه با غلظتهای ۲۴ و ۱۲ میکرو مولار از نانوذرات نقره انجام گرفت که برای هرکدام این گروهها در زیرگروههای مختلف، شرایط متفاوتی از پالسهای الکتریکی در قالب ۸ پالس در قدرت ۲۵۰۰ ولت بر سانتی متر و پهناهای زمانی مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروثانیه در حضور و بدون حضور نانوذرات نقره اعمال شد. بعد از اعمال پالس ها و گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون انگل و نانوذرات نقره ، بروش MTS، درصد بقای انگلها تعیین و محاسبه گردید. برای اطمینان از نتایج، هر آزمایش چهار بار تکرار شد. در نهایت، تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار آماریSPSS انجام گرفت. جهت مقایسه داده ها با توجه به تبعیت آنها از توزیع طبیعی، از آزمونهای آنالیز واریانس یک طرفه و توکی بهره گیری شد.

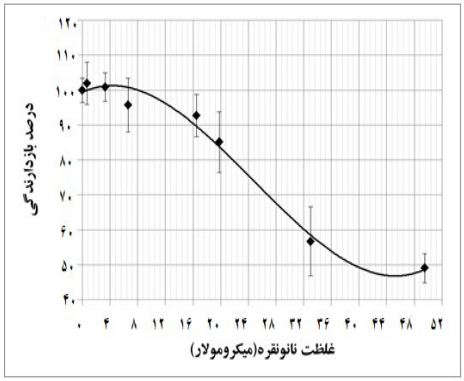
## نتایج

در بخش اول سمیت نانوذرات نقره تعیین شد و بر اساس نتایج نشان داده شده در نمودار (۱)، غلظتی از نانوذرات نقره که می تواند ۵۰٪ پروماستیگوتها را از بین ببرد، ۳۹/۲ میکرومولار به دست آمد.

در بخش دوم اثر پالسهای الکتریکی به تنهایی و در حضور نانوذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد افزایش پهنای زمانی پالس بتنهایی موجب نوساناتی در بقای پروماستیگوتها شده که نسبت به یکدیگر معنی دار نبوده است ($p>0/66$). البته حضور نانوذرات نقره و اعمال همزمان پالسهای الکتریکی افت معنی داری در کاهش بقای انگل فراهم می نماید ($p<0/005$).

Archive of SID

www.SID.ir




**نمودار۱**- سمیت ناشی ازنانوذرات نقره روی انگل بدون اعمال پالس الکتریکی. غلظتهای مختلف از نانوذرات نقره برحسب میکرومولار به مدت ۲۴ساعت با انگل انکوبه گردید، هر آزمایش ۴ بار تکرار و داده ها بیانگر میانگین ± انحراف معیار داده هاست.

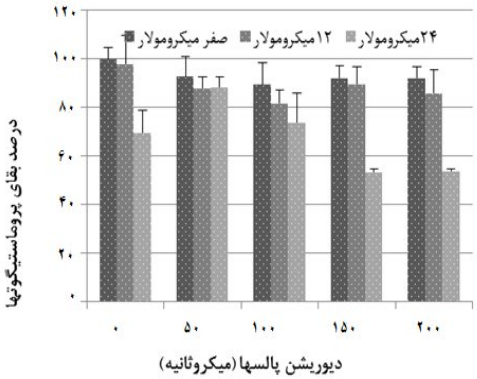
آزمایشات بر پروماستیگوتهای لیشمانیا ماژور نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات نقره از۱۲ به ۲۴ میکرومولار ضمن اعمال پالسهای الکتریکی با دیوریشن ۱۵۰ میکروثانیه باعث افت معنی دار در بقای پروماستیگوتها شده است ($p<۰/۰۰۱$).

غلظت ۲۴ میکرو مولار نانوذرات نقره نسبت به گروه مشابه بدون آن (از نظر دریافت پالس) معنی دار بوده ($p<۰/۰۰۱$)، اما هیچ تفاوت معنی داری بین گروههای با غلظت صفر(کنترل) و ۱۲میکرو مولار 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 ($p<۰/۰۰۴$).

در غلظت ۱۲میکرومولار از نانو نقره نیز با اعمال پالسهای با پهنای زمانی ۱۰۰و ۲۰۰ میکرو ثانیه تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شده است ($p<۰/۰۰۴$).

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.




**نمودار۲**-اثر پهنای زمانی پالس روی میزان تکثیر و بقای پروماستیگوتها. ولتاژ ۵۰۰ ولت، قدرت پالس ۲۵۰۰ولت بر سانتی متر، تعداد پالس ۸، فرکانس ۱هرتز، در دیوریشن های زمانی مختلف بر حسب میکروثانیه برای ۳ غلظت صفر، ۱۲ و۲۴ میکرومولار از نانوذرات نقره نشان داده شده است، هر آزمایش ۴ بار تکرار گردیده و داده ها بیانگر میانگین ± انحراف معیار داده هاست.

## بحث

طبق مطالعه ی حاضر به نظر می رسد که همیاری پالسهای الکتریکی با نانو ذرات نقره در غلظت ۲۴ میکرو مولار با اعمال پالسهای با دیوریشن ۱۵۰ میکروثانیه، قدرت ۲۵۰۰ ولت برسانتی متر و تعداد ۸ پالس، برای افزایش میزان کشندگی پروماستیگوتها موفقیت آمیز بوده ($p<۰/۰۰۴$)، ولی افزایش پهنای زمانی پالس به تنهایی اثرکشندگی معنی داری بر انگل لیشمانیا ماژور نداشته است.

از جمله نقاط قوت این مطالعه می توان 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 می دهد، اشاره کرد. ضمنا با فراهم آمدن امکان کاهش دوز نانوذرات نقره مورد نیاز، کاهش عوارض جانبی سیستمیک نانوذرات نقره در درمان حاصل می شود و بالاخره فراهم آمدن امکان اجرای درمانهای موضعی را نیز نباید نادیده گرفت. به عبارت دیگر به نظر می رسد که کاربرد پالسهای

Archive of SID
www.SID.ir

الکتریکی با زمان کوتاه در حد میکروثانیه توانسته تعدادی منفذ موقتی در غشای پروماستیگوتها ایجاد کند و این موجب ورود نانوذرات نقره ی بیشتری به داخل پروماستیگوت شده و با ایجاد سمیت، موجبات مرگ پروماستیگوتها را فراهم کند. با توجه به عدم تفاوت معنی دار بین گروههای بدون نانوذرات نقره و دریافت کننده پالس به نظر می رسد پالسهای الکتریکی با شرایط اعمال شده هیچگونه تاثیر تخریبی دائمی بر غشای پروماستیگوتها نداشته است بنابراین می توان نتیجه گرفت اثر پالس گذرا و موقتی بوده است، هرچند که افزایش دیوریشن می توانسته منجر به افزایش سایز منافذ در غشای سلولی یا باکتریایی شود.

با توجه به آنکه از قدرت ۲۵۰۰ ولت بر سانتی متر و دیوریشن ۱۰۰میکروثانیه به بعد افت چشمگیری در درصد بقای پروماستیگوتها ظاهر شده به نظر می رسد ابعاد منافذ غشا با دریافت پالسهای با پهنای زمانی ۱۵۰میکروثانیه، بحدی افزایش یافته که با ورود بیشتر نانوذرات نقره نتیجه مذکور به دست آمده است.

افزایش دیوریشن از ۱۵۰ به ۲۰۰ میکروثانیه تغییر معنی داری بر کاهش درصد بقای پروماستیگوتها ایجاد نکرده است. در شرایط این تحقیق به نظر می رسد حتی دیوریشن ۱۵۰ میکروثانیه برای ایجاد مرگ سلولی مناسب باشد. از آنجا که تا کنون تحقیقی مبنی بر درمان ترکیبی الکتروپوریشن و نانوذرات نقره بر انگل لیشمانیا گزارش نشده است، به بررسی مطالعاتی پرداخته می شود که اثر الکتروپوریشن را بر DNA و یا بعضی رده های سلولی بررسی کرده اند.

در مطالعه گلبرگ[1] (۲۰۱۰) اثر پارامترهای مختلف الکتروپوریشن بر DNA سلول بررسی شده است (۱۶). وی از قدرت میدان الکتریکی ۵۰۰ ولت بر سانتی متر، تعداد پالس ۸ تا، فرکانس ۱هرتز و پهناهای زمانی مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰) میلی ثانیه یعنی شرایط بینابینی الکتروپوریشن برگشت پذیر و غیرقابل برگشت برای افزایش نفوذپذیری پوست و جهت تحویل دارو و واکسن DNA استفاده کرده است و نشان داد که بدین ترتیب یک ارتباط قوی بین دیوریشن زمانی پالسها و تغییرات در DNA وجود دارد.

با مقایسه ی مطالعه بالا و تحقیق حاضر به نظر می رسد که هر چه دیوریشن زمانی طولانی تر انتخاب شود باید قدرت میدان الکتریکی اعمالی پایینتر باشد تا برگشت پذیر بودن الکتروپوریشن احراز شود. شاید بتوان گفت ایجاد تاثیر بر DNA مستلزم ایجاد تغییر برگشت ناپذیر در غشا نیست (۱۶).

در مطالعه آنتو[2] در سال ۲۰۰۴ اثر الکتروپوریشن بر تراوایی غشا دو رده سلولی در حضور BSA- FITC در ولتاژهای ۲/۵تا۲۰ولت برسانتی متر و پهنای زمانی ۱۸۰ میکروثانیه موفقیت آمیز گزارش کرد (۱۷).که در مقایسه با مطالعه ی حاضر از نظر ولتاژ با اعمال قدرت کمتری به نتیجه ی مطلوب رسیده است. دلیل این اختلاف می تواند مربوط به اندازه پروماستیگوتها (در ابعاد خیلی کوچکتر در حدود ۱۴-۲۰ میکرون طول و ۴-۱/۵میکرون عرض) و احتمالا ولتاژ غشای آنها باشد که مقاومت بیشتری در برابر تخریب غشای سلولی و همچنین الکتروتراوایی از خود نشان می دهند. رایج ترین نظریه، جهت غیر فعال کردن میکروبها استفاده از الکتروپوریشن شدید (یعنی شکل گیری منافذ با پالس های الکتریکی ولتاژ بالا) است که باعث ناپایداری محلی در غشای میکرو ارگانیسم تحت درمان با پالس الکتریکی و در نتیجه غیر فعال کردن میکروبها می شود (۱۸). مطالعات بسیاری نشان داده اندکه برای غیر فعال کردن میکرو ارگانیسم ها (استریلیزاسیون در مقیاس آزمایشگاهی)، پالس های الکتریکی با شدت بالاتر از ۳۰ کیلو ولت بر سانتی متر و دیوریشن های بالاتر از ۱۰۰ میکروثانیه لازم است (۱۹). این در حالی است که درشرایط مطالعه ی حاضر از قدرت ۲/۵ کیلو ولت بر سانتی متر و دیوریشن ۱۵۰ میکروثانیه جهت تراوا کردن غشای انگل لیشمانیا نسبت به نانوذرات نقره بهره گرفته شده است.

سایز نانوذرات، مساحت سطح و سطح عامل دار یکی ازعوامل اصلی تاثیر بربیوکینتیک و سمیت آنها به شمار می رود (۲۰).

مکانیسمهای احتمالی تاثیر نانوذرات نقره را می توان به صورتهای زیر پیش بینی نمود:

[1] Golberg

[2] Antov

Archive of SID

www.SID.ir

نانوذرات نقره با سایز کوچک و سطح زیاد دردسترس 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 سال۲۰۱۱) و (Mohebali سال۲۰۰۹) منتشر گردیده است (۱۳،۲۱). مشاهده شده که آسیب ساختاری و عملکردی میتوکندری باعث مهار فعالیت متابولیک می شود و بدنبال آن کاهش عملکرد ATP رخ می دهد. بر اساس نظر آشارانی[1] (۲۰۰۹)کم شدن ATP و یا فعالیت میتوکندری 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 میتوکندری 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 پالسهای الکتریکی کوتاه در فازهای بعدی مطالعه، به نظر می رسد بتوان در درمان لیشمانیوز جلدی از دوز پایینی از نانوذرات نقره بصورت موضعی بهره جست.

## نتیجه گیری

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

## تشکر وقدردانی

بدین وسیله ازکمیته تحقیقات دانشجویی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل تامین اعتبار هزینه اجرای این طرح به شماره ۹۰۰۳۱۴ قدردانی می‌شود.

[1] AshaRani

Archive of SID
www.SID.ir

## *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 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 Electropermeability 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. Mohebali M, Gilani K, Sarkar S ,Akhoundi B, Esmaeili 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, Valiyaveettil 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.

Archive of SID

www.SID.ir