Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(79): 27- 37

In vitro evaluation of the effect of gold nanoparticles on Giardia lamblia cyst

Bavand Z[1], Gholami Sh[2*] , Honary S[3] , Rahimi-Esboei B[4] , Torabi N[4] , Barabadi H[1]

1- Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2- Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3- Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran university of Medical sciences, Sari, Iran
4- Student of Medical Parasitology, Faculty of medicine, zanjan University of Medical Sciences, zanjan, Iran

Received:8 Sep 2013, Accepted: 4 Dec 2013

Abstract

Background: Given the importance of treatment of Giardiasis, particularly the resistance of protozoan to drugs used for the treatment, the aim of present study was to investigat the effect of gold nanoparticles on Giardia lamblia cysts in vitro.

Materials and Methods: In this experimental study, Giardia cysts were collected from stool and concentrated and isolated over 0.85 M-sucrose. Then, gold nanoparticles were prepared at concentrations of 0.05, 0.1, and 0.3 mg/ml. The effect of different concentrations of the nanoparticles at minutes 5, 15, 30, 60, and 180 was evaluated and compared to control groups. Obtained data recorded and statistically analyzed.

Results: The cytotoxic effect of nanoparticles on the Giardia cysts in vitro compared with the Metronidazole has shown mean percent of effect gold nanoparticles increased with increasing concentration and exposure time, so that the concentration of 0.3 mg/ml from 62% at 5 min to 96% at 180 min increased ($p < 0.05$). Also, the increasing exposure time, killing effect of gold nanoparticles at a concentration of 78% in 0.05 mg/ml to 96% at a concentration of 0.3 mg / ml greatest increased ($p < 0.05$). As a result, the concentration of gold nanoparticles in comparison with Metronidazole, cytotoxic effect of gold nanoparticles at a concentration of 0.3 mg / ml is similar to the effect of Metronidazole in the treatment of Giardia.

Conclusion: The results of this study show that gold nanoparticles at a concentration of 0.3 mg/ml can be used as an effective combination for killing Giardia cysts in vitro. Thus, future studies on laboratory animals are recommended.

Keywords: Cysts, Giardia lamblia, Gold, In Vitro

Corresponding author:*
Department of Parasitology & Mycology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
Emali*:* sgholami200@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 16، شماره 10 (شماره پیاپی 79)، دی 1392، 27- 37

بررسی تاثیر نانو ذرات طلا بر روی مرحله کیستی ژیاردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی

زهرا باوند[1]، شیرزاد غلامی[2*]، سهیلا هنری[3]، بهمن رحیمی اسبویی[4]، نگین ترابی[4]، حامد برآبادی[1]

1. دانشجوی دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. دانشیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموزیس، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. دانشجوی دکترای تخصصی انگل شناسی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: 92/6/17 تاریخ پذیرش: 92/9/13

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت درمان بیماری ژیاردیازیس در مبتلایان، به ویژه وجود مقاومت تک یاخته به داروهای مورد استفاده برای درمان، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر نانو ذره طلا بر روی مرحله کیستی انگل ژیاردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی(In vitro) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر کیست‌های ژیاردیا از مدفوع‌های جمع‌آوری و با استفاده از روش ساکارز 0/85 مولار تغلیظ و جداسازی شد. سپس نانو ذرات طلا در سه غلظت 0/05 ، 0/1 ، 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه و تاثیر غلظت‌های مختلف از آن بر حیات کیست در زمان‌های 5، 15، 30، 60 و 180 دقیقه در سه مرحله در مقایسه با گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. اطلاعات حاصل ثبت و از لحاظ آماری تجزیه تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی نشان می‌دهد. میانگین درصد کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 62 درصد در 5 دقیقه به 96 درصد در 180 دقیقه افزایش می‌یابد($p<0/5$). هم‌چنین با افزایش زمان مجاورت بیش‌ترین اثر کشندگی نانو ذره طلا از 78 درصد در غلظت 0/05 میلی‌گرم/میلی‌لیتر تا 96 درصد در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر می‌باشد($p<0/5$). در نتیجه با توجه به غلظت‌های نانو ذرات طلا استفاده شده در مقایسه با مترونیدازول، تأثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر تقریبا مشابه میزان تأثیر داروی مترونیدازول در درمان ژیاردیا است.

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر به عنوان یک ترکیب موثر جهت از بین بردن کیست‌های ژیاردیا در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند مورد استفاده قرارگیرد. مطالعات بر روی حیوانات آزمایشگاهی توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: ژیاردیا لامبلیا، شرایط آزمایشگاهی، مرحله کیستی، نانو ذرات طلا

*** نویسنده مسئول:** دانشگاه علوم پزشکی مازندران، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی و مرکز تحقیقات توکسوپلاسموزیس

Emali: sgholami200@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ژیاردیا لامبلیا(Giardia lambelia) تک یاخته تاژک‌دار روده کوچک انسان می‌باشد که از تمام نقاط دنیا گزارش شده است. میزان آلودگی آن در مناطق مختلف جهان از 1 تا 25 درصد متفاوت است(1، 2). ژیاردیا لامبلیا از شایع‌ترین انگل‌های روده‌ای در کشور ما ایران به خصوص نواحی شمال است(3، 4). تخمین زده می‌شود سالانه 280 میلیون عفونت انسانی در سراسر جهان ایجاد می‌شود. ژیاردیا لامبلیا، عامل ژیاردیازیس، می‌باشد که در مناطق با آب و هوای معتدل و گرمسیری یافت می‌شود و می‌تواند باعث بیماری اسهال(استئاتوره) به خصوص در کودکان و سوء جذب روده‌ای و از دست دادن وزن شود(2، 3). با توجه به انتظار مقاومت انگل به دارو در کشور ما، پیش‌گیری و درمان این بیماری به ویژه در کودکان بسیار ضروری است(5، 6).

با توجه به تنوع ژنتیکی انگل تعیین ایزوله، کشت و تست‌های تعیین حساسیت ژیاردیا به علت تفاوت نتایج، کار مشکلی است و بیشتر اطلاعات در مورد تأثیر دارو بر تجربیات بالینی استوار بوده است. چنان چه درمان شیمیایی این بیماری بر اساس تجویز یکی از چهار داروی مترونیدازول، فورازولیدون، تینیدازول و کیناکرین صورت می‌گیرد که این داروها اثرات جانبی متعددی دارند و تأثیر آن‌ها قطعی نیست(7، 8). اثرات سرطان‌زایی و جهش‌زایی برخی از آن‌ها نیز در مدل‌های حیوانی گزارش شده است(8). هم‌چنین داروهای فوق دارای خاصیت سرطان‌زایی در زنان و بچه‌ها می‌باشند و در دوران بارداری نیز منع مصرف دارند(9). از طرفی گزارش‌هایی از بروز مقاومت انگل نسبت به داروهای فوق وجود دارد(9- 13). بنابر این مصرف این داروها به دلیل عوارض و مقاومت انگل قابل بحث است. عفونت ژیاردیازیس به وسیله کیست منتقل و شیوع پیدا می‌کند و فرم تروفوزوئیت آن در بیماران اهمیت دارد. لذا برای از بین بردن کیست و تروفوزوئیت روش‌های مختلفی پیشنهاد می‌شود که یکی از راه‌های پیشنهادی توسط سازمان جهانی بهداشت، کاربرد گیاهان و مواد خوراکی طبیعی در از بین بردن کیست انگل می‌باشد(14). علاوه بر داروهای مصرفی مترونیدازول، فورازولیدون، تینیدازول و کیناکرین در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان به واسطه اثرات جانبی کم یا هیچ آن‌ها رو به افزایش می‌باشد(11).

نانوذرات طلا به عنوان ضد HIV، آنتی آنژیوژنز (anti angiogenesis)، ضد مالاریا و ضد درد مفاصل عامل استفاده می‌شود. علاوه بر این با توجه به این‌که از نانو ذرات در زمینه‌های مختلف به خصوص در علوم زیستی و پزشکی استفاده می‌شود خواص الکترونیکی نانو ذرات طلا را می‌توان نه تنها با تغییر اندازه آن‌ها بلکه ماهیت عامل پوشش و فاصله بین نانو ذرت تنظیم کرد که این وابسته به روش سنتزی به کار رفته می‌باشد. روش‌های مختلفی برای سنتز نانو ذرات طلا وجود دارد که به دسته شیمیایی فیزیکی و بیولوژی تقسیم بندی می‌شوند(13، 15). کاهش شیمیایی روش کاربردی برای تهیه نانوذرات فلزی، به روش بیولوژیکی یا سنتز نانو ذرات ترجیح داده می‌شود. طلا(Au) عنصر شیمیایی است که علاوه بر زیبایی، مانند نقره خاصیت آنتی باکتریال دارد و از این خاصیت فلز در صنعت، پزشکی و غیره استفاده می‌کنند(21- 16). این فلز به عنوان داروی غیر الی در درمان برخی بیماری‌ها مثل آرتریت روماتوئید و اخیرا با اثر ضد توموری و در درمان لیشمانیای پوستی به کار برده شده است(26 -22). علاوه بر این تحقیقاتی در مورد اثر فلزاتی مثل طلا همراه با برخی داروها مثل کلروکین، پنتادیامین، کلوتریمازول و کتوکونازول به عنوان لیگاند علیه مالاریا وتریپانوزومیاز و لیشمانیوز انجام شده است. نوعی کمپلکس از طلا با DNA وارد واکنش شده و در شرایط آزمایشگاهی روی رشد انگل‌های لیشمانیا مکزیکانا و لیشمانیا ماژور موثر بوده است(4، 6 و 18).

بنابر این مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر(اثر کشندگی) نانو ذرات طلا برروی کیست ژیاردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی(vitro In) انجام شد. نتایج این مطالعه می‌تواند جهت یافتن ترکیبی جایگزین در درمان انگل ژیاردیا مورد استفاده قرارگیرد که فاقد معایب داروهای

Archive of SID
www.SID.ir

مورد استفاده در درمان به ویژه اثرات جانبی داروهای شیمیایی باشد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر کیست‌های ژیاردیا از مدفوع‌های تازه آلوده(20 نمونه با شدت آلودگی بالا) از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی مازندران جمع آوری شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از روش ساکارز 0/85 مولار تغلیظ گردید. برای جداسازی کیست ژیاردیا 10 تا 15 گرم از نمونه‌های مدفوع را با 10 برابر آب مخلوط کرده و با استفاده از گاز دو لایه صاف شدند. پس از صاف کردن نمونه‌ها محلول حاصل را در دور 400 به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل را مجددا با 10 برابر حجم آب مخلوط و با همان سرعت و زمان سانتریفوژ و به رسوب حاصل 5 میلی‌لیتر آب اضافه شد. محلول فوق به 3 میلی‌لیتر محلول ساکارز 0/85 مولار که از قبل آماده شده بود، به آرامی اضافه گردید. سپس نمونه‌ها با دور 600 در مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. از سه لایه تشکیل شده پس از سانتریفوژ، کیست‌ها را از بین لایه‌های اول و دوم با پیپت پاستور جمع‌آوری و پس از دو بار شستشو با آب مقطر برای انجام آزمایش آماده شدند. برای شمارش کیست‌ها از لام نئوبار استفاده شد. در ضمن نمونه‌ها را می‌توان در دمای 4 درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایشات مرحله بعد نگهداری کرد(3، 22).

در مطالعه حاضر از نانو ذرات طلا در سه غلظت 0/05 ، 0/1 و 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر استفاده گردید. تهیه نانو طلا در گروه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی ساری با روش استاندارد انجام شد. قارچ پنیسیلیوم سیترینوم در محیط کشت مایع czapek dox broth کشت شد و پس از انکوباسیون در شیکر انکوباتور در دمای 28 درجه سانتی‌گراد با دور 200 rpm به مدت 10 روز، قارچ‌های رشد کرده از محیط کشت جدا گردید. سپس به 100 میلی‌لیتر از محیط کشت مایع(سوپرناتانت)، 100 میلی‌لیتر محلول 1 میلی‌مولار کلرید طلا اضافه کرده و دوباره در دمای 28 درجه سانتی‌گراد برای مدت 24 ساعت انکوبه گردید. پس از آن، تولید نانو ذرات به صورت ماکروسکوپی، با تغییر رنگ محیط از زرد به بنفش و بررسی λ_{Max} با روش UV و عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی SEM اثبات و اندازه ذرات توسط دستگاه Zeta sizer (Malvern, England) تعیین گردید(13، 14 و 21).

تاثیر نانو ذرات طلا برروی کیست: در این مطالعه غلظت‌های 0/05، 0/1 و 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر از نانو ذرات طلا تهیه شد سپس مقدار 2 میلی‌لیتر از هر غلظت در لوله آزمایش جداگانه آماده و به هر لوله آزمایش 10000 کیست ژیاردیا لامبلیا اضافه شد و در نهایت تاثیر غلظت‌های مختلف از گیاه بر حیات کیست(میزان زنده بودن) در زمان‌های 5، 15، 30، 60 و 180 دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت(4). برای تعیین درصد حیات کیست‌ها از روش رنگ آمیزی حیاتی کیست‌ها با ائوزین 0/1 درصد استفاده شد و هر آزمایش برای تائید سه بار در شرایط 37 درجه سانتی‌گراد تکرار شد. اطلاعات حاصل از مطالعه در مقایسه با گروه کنترل مثبت که حاوی کیست و مترونیدازول با غلظت 5 میلی گرم /میلی‌لیتر، بود ثبت گردید. در این مطالعه میانگین، درصد بقای کیست‌ها و میانگین سرعت نابودی کیست‌ها بر حسب زمان‌های انتخابی در مطالعه برون تنی در گروه آزمون و کنترل محاسبه شده و داده‌های به دست آمده در مطالعه به وسیله آزمون تی(T-test وt-student) و کای دو(Chi-square) با استفاده از نرم افزارSSPS تجزیه تحلیل آماری شد.

یافته‌ها

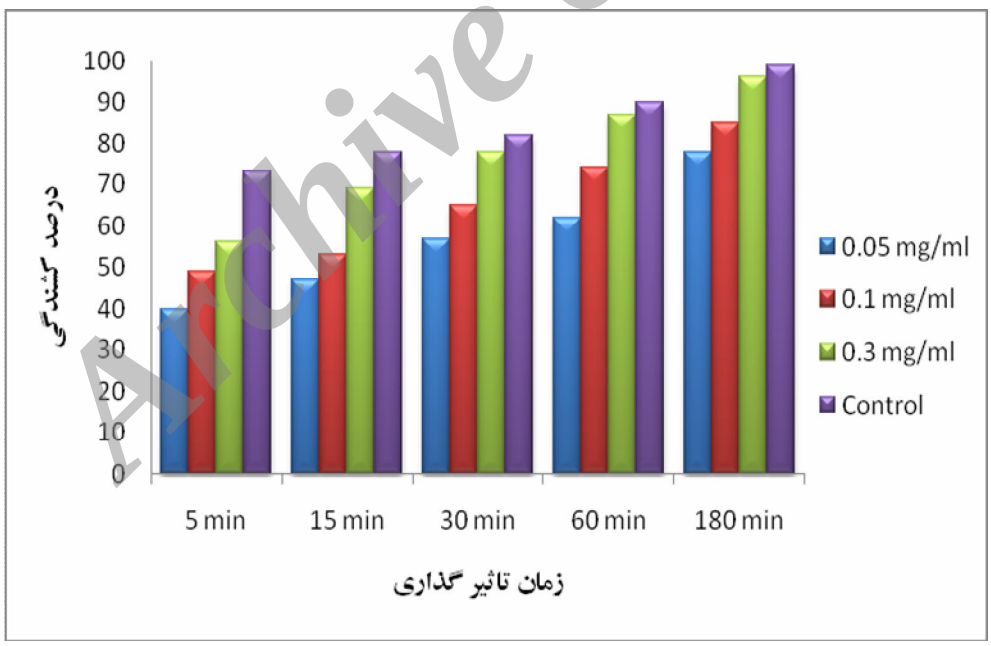
نتایج حاصل از بررسی اثر کشندگی نانوذرات طلا در غلظت‌های 0/05 ، 0/1 و 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر در زمان‌های 5، 15، 30، 60 و 180 دقیقه بر روی کیست ژیاردیا لامبلیا جمع آوری شده از افراد آلوده (ایزوله‌های انسانی) در شرایط آزمایشگاهی(In vitro) در مقایسه با کنترل مثبت(مترونیدازول)به صورت زیر بود:

Archive of SID
www.SID.ir

1- با تأثیر غلظت 0/05 میلی‌گرم/میلی‌لیتر بر روی کیست‌های ژیاردیا زنده(10000 کیست در هر مرحله) در چهار زمان متفاوت میانگین درصد کشندگی نانو ذرات طلا با افزایش غلظت و زمان مجاورت از 40 درصد در 5 دقیقه به 78 درصد در 180 دقیقه افزایش یافت، در صورتی که در غلظت 0/1 میلی‌گرم/میلی‌لیتر با افزایش زمان مجاورت درصد کشندگی نانو ذرات طلا از 49 درصد در 5 دقیقه به 85 درصد در 180 دقیقه و در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 62 درصد در 5 دقیقه به 96 درصد در 180 دقیقه افزایش یافت که بیانگر تأثیر کشندگی نانو ذرات طلا با افزایش غلظت و زمان مجاورت بر روی کیست‌های ژیاردیا لامبلیا می‌باشد که این تفاوت در میزان تأثیر از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد($p<0/5$) (جدول 1، نمودار 1)

جدول 1. میانگین درصد تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات طلا بر روی کیست‌های ژیاردیا لامبلیا در زمان‌های مختلف

زمان تاثیر نانو ذره / غلظت نانو ذرات طلا	5 دقیقه (درصد)	15 دقیقه (درصد)	30 دقیقه (درصد)	60 دقیقه (درصد)	180 دقیقه (درصد)
0/05 میلی‌گرم/میلی‌لیتر	40	47	57	62	78
0/1 میلی‌گرم/میلی‌لیتر	49	53	65	74	85
0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر	56	69	78	87	96
کنترل مثبت(مترونیدازول)	73	78	82	90	99

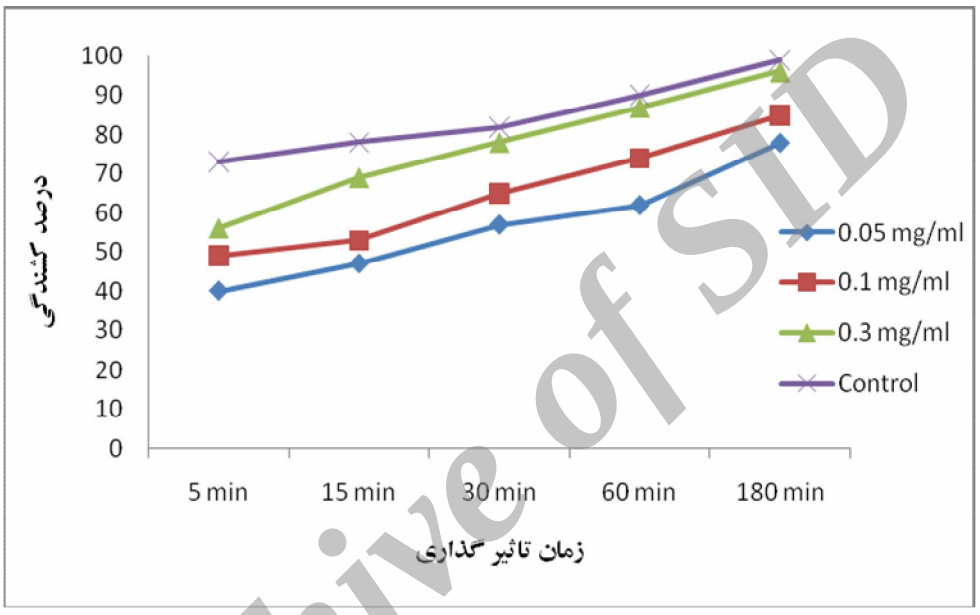


نمودار 1. میانگین درصد تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات طلا بر روی کیست‌های ژیاردیا لامبلیا در زمان‌های مختلف

2. بررسی تأثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت‌های 0/05، 0/1 و 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر بر حسب زمان در مقایسه با داروی مترونیدازول (کنترل مثبت)نشان می‌دهد که با افزایش زمان مجاورت کیست‌های ژیاردیا لامبلیا با نانو ذرات طلا با میانگین درصد کشندگی از 40 درصد در غلظت 0/05 میلی‌گرم/میلی‌لیتر، 49 درصد در غلظت 0/1 میلی‌گرم/میلی و 56 درصد در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی در مقایسه با میانگین درصد کشندگی در

Archive of SID
www.SID.ir

180 دقیقه در سه غلظت فوق بیش‌ترین اثر کشندگی از 78 درصد در غلظت 0/05 افزایش یافته و تا 96 درصد در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی مشاهده شد که این اختلاف با افزایش غلظت و زمان از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد($p<0/5$). در نتیجه نانو ذرات طلا در حداقل غلظت موثر(0/05 میلی‌گرم/میلی) با افزایش زمان مجاورت(در 180 دقیقه) دارای میزان کشندگی حدود 80 درصد و در غلظت 0/3 میلی مولار در 180 دقیقه 96 درصد می‌باشد هر چند در مقایسه میزان کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 1/5 میلی‌مولار در 180 دقیقه با مترونیدازول این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد($p<0/5$) (جدول 1، نمودار 2).



نمودار 2. میانگین درصد تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات طلا بر روی کیست‌های ژیاردیا لامبلیا در زمان‌های مختلف

3. با مقایسه اثر کشندگی نانو ذرات طلا بر روی کیست‌های ژیاردیا لامبلیا در سه غلظت متفاوت نتایج بررسی نشان می‌دهد که بیش‌ترین اثر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر در 180 دقیقه(3 ساعت) 96 درصد بوده است که در مقایسه با گروه با غلظت 0/1 میلی‌گرم/میلی 85 درصد در 180 دقیقه میزان تاثیر نانو ذره طلا افزایش یافته است این اختلاف با توجه به 3 برابر شدن غلظت معنی‌دار نمی‌باشد($p<0/5$). مقایسه نتایج تاثیر نانو ذره طلا بر روی کیست‌های ژیاردیا در سه غلظت مورد استفاده در زمان‌های متفاوت با کنترل مثبت(مترونیدازول) نشان می‌دهد که میانگین اثر گشندگی مترونیدازول در 180 دقیقه 99 درصد بوده است. این اختلاف بین غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی و مترونیدازول(کنترل مثبت) معنی‌دار نمی‌باشد ($p<0/5$). اما در مقایسه دو غلظت دیگر این اختلاف تا حدودی معنی‌دار می‌باشد(جدول 1). در نتیجه با توجه به غلظت‌های نانو ذرات طلا استفاده شده در این مطالعه در مقایسه با مترونیدازول که غلظت دارویی آن 5 میلی‌گرم /میلی‌لیتر است تأثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر نزدیک به میزان تأثیر داروی مترونیدازول به عنوان داروی انتخابی در درمان ژیاردیا لامبلیا است. ضمنا نتایج این تحقیق نشان می‌دهد داروی مترونیدازول در غلظت ثابت با افزایش زمان مجاورت 60 و 180 دقیقه با کیست‌های ژیاردیا در مقایسه با زمان‌های 5، 15 و 30 دقیقه میزان تاثیر گشندگی بیشتری از خود نشان داده است (نمودار 1 و 2).

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

با توجه به این که در سال‌های اخیر استفاده از نانو ذرات فلزی مانند طلا در درمان بیماری‌های انگلی شایع در انسان مانند لیشمانیازیس و ژیاردیا زیس به دلیل خواص آنها به عنوان یک رویکرد جدید در تحقیقات پزشکی مطرح می‌باشد(5، 7 و 11) در مطالعه حاضر تاثیر غلظت‌های متفاوت نانو ذرات طلا با توجه به خواص این فلز در محیط آزمایشگاهی بر روی کیست‌های ژیاردیا لامبلیا ایزوله‌های انسانی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های متفاوت نانو ذرات طلا(0/05، 0/1، 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر) بر روی کیست ژیاردیا در شرایط آزمایشگاهی با افزایش غلظت نانو ذرات طلا در زمان معین به ویژه 60 و 180 دقیقه میانگین درصد کشندگی بر روی کیست‌ها افزایش می‌یابد. از طرفی در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت نانو ذرات طلا در هر یک از غلظت‌ها درصد کشندگی و تاثیر آن در از بین بردن کیست‌های ژیاردیا به ویژه در غلظت‌های 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر افزایش یافته است به نحوی که بیش‌ترین اثر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر در 180 دقیقه(3 ساعت) به 96 درصد مشاهده می‌شود که در مقایسه با گروه با غلظت 0/1 میلی‌گرم/میلی‌لیتر 85 درصد در 180 دقیقه میزان تاثیر بیشتر است.

از طرفی مقایسه نتایج تاثیر نانو ذره طلا بر روی کیست‌های ژیاردیا در سه غلظت مورد استفاده در زمان‌های متفاوت با کنترل مثبت(مترونیدازول) نشان می‌دهد که میانگین اثر کشندگی مترونیدازول در 180 دقیقه 99 درصد بوده است در نتیجه با مقایسه نانو ذره طلا با مترونیدازول که غلظت دارویی آن 5 میلی‌گرم/میلی‌لیتر است تأثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت کمتر یعنی 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر نزدیک به میزان تأثیر داروی مترونیدازول به عنوان داروی انتخابی در درمان ژیاردیا لامبیا است که می‌باید در مطالعات تکمیلی در آینده به ویژه در مطالعات برون تنی(In vitro) در محیط کشت انگل بر روی ترفوزوئیت و درون تنی(In vivo) در حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرارگیرد. با توجه به این‌که این تاثیر بر روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان مطالعه نشده است انجام مطالعات کارآزمایی‌های بالینی نیز در این ارتباط پیشنهاد می‌شود.

هم‌چنین در سال‌های اخیر در زمینه استفاده از نانو ذرات فلزی مانند طلا به عنوان داروی غیر آلی در درمان برخی بیماری‌ها مانند آرتریت روماتوئید و اخیرا با اثر ضد توموری و در درمان لیشمانیای پوستی مطالعات محدودی انجام شده است(19- 21). علاوه بر این تحقیقاتی در مورد اثر فلزاتی مثل طلا همراه با برخی داروها مثل کلروکین، پنتادیامین، کلوتریمازول و کتوکونازول به عنوان لیگاند علیه مالاریا و تریپانوزومیاز و لیشمانیوز انجام شده است. نوعی کمپلکس از طلا با DNA وارد واکنش شده و در شرایط آزمایشگاهی روی رشد انگل‌های لیشمانیا مکزیکانا و لیشمانیا ماژور موثر بوده است. بنابر این بررسی تاثیر نانو ذره طلا در بر روی تک یاخته ژیاردیا می‌تواند در شناخت روش‌های درمانی موثر در بیماری ژیاردیازیس در آینده با اثرات جانبی کم باشد(5، 7). هم‌چنین در مطالعه ترابی و همکاران با استفاده از نانو ذرات طلا برای درمان لیشمانیوز پوستی حیوانی نوع روستایی که عامل آن لیشمانیا ماژور سوش ایرانی است در مدل حیوانی با عصاره متانولی از اکالیبتوس کامالدونیس انجام شد. در این مطالعه تجربی تاثیر دو غلظت از نانو ذرات طلا بر علیه عامل لیشمانیای پوستی سوش لیشمانیا ماژور ایرانی بر روی 61 موش بررسی شد. در این مطالعه دو غلظت 4 و40 میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو ذره طلا دو بار در روز به مدت 30 روز برای درمان مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد اماستیگوت انگل در زخم به طور معنی داری کاهش یافته است. محلول نانو ذره طلا هم‌چنین میزان مرگ موش‌ها را کاهش داده است. ضمنا در این مطالعه درصد کشندگی انگل گزارش نشد هرچند تعداد اماستیگوت انگل در زخم به طور معنی داری کاهش یافت(7).

ژیاردیا لامبلیا عامل بیماری ژیاردیازیس در کشور ما در مناطق مختلف به ویژه شمال ایران از شیوع بالایی نسبت به سایر تک یاخته‌های روده‌ای برخوردار است. کنترل

Archive of SID
www.SID.ir

عفونت ناشی از ژیاردیا لامبلیا به ویژه در مبتلایان به گاستروانتریت در گروه‌های سنی مختلف با روش‌های درمانی مناسب به خصوص استفاده از ترکیبات داروهای گیاهی به دلیل اثرات جانبی کم و عدم مقاومت انگل نسبت به این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی مانند مترونیدازول از اولویت خاصی در تحقیقات برخودار است. مطالعه تاثیر خواص نانو ذرات و گیاهان بومی هر منطقه بر روی مرحله کیستی و تروفوزوئیت در تحقیقات سال‌های اخیر، توسط سازمان جهانی بهداشت و بعضی از محققین پیشنهاد شده است(27- 28). در مطالعه شهابی و همکاران در بررسی اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زنبان بر کیست‌های ژیاردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی پس از 60 دقیقه تماس عصاره یا اسانس با کیست ژیاردیا لامبلیا حداقل غلظت عصاره هیدروالکلی و اسانس زنبان 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس 120 دقیقه 75 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از 180 دقیقه 75 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در این مطالعه اثر کشندگی هیدرو الکلی و اسانس زنبان در محیط آزمایشگاه بر روی کیست‌های ژیاردیا گزارش شد. در این مطالعه نتایج 180 دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره الکلی باعث از بین رفتن 100 درصد کیست‌های ژیاردیا شده است که با نتایج تحقیق حاضر در غلظت 1/5 میلی‌مولار تا حدودی مطابقت دارد(24). هم‌چنین در مطالعه رحیمی و همکاران و غلامی و همکاران تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا و آلزی که گیاهان بومی استان مازندران است با توجه به خصوصیات و ترکیبات آن دو گیاه، بر روی کیست‌های ژیاردیا در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا و آلزی بر روی کیست ژیاردیا در شرایط آزمایشگاهی با افزایش غلظت گیاه در زمان معین میانگین درصد کشندگی بر روی کیست‌ها افزایش می‌یابد. از طرفی در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در هر یک از غلظت‌ها درصد کشندگی و تاثیر گیاهی در از بین بردن کیست‌های ژیاردیا(یا درصد کشندگی) به نحو معنی داری به ویژه در غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش می‌یابد. در این تحقیق با توجه به اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا بر روی کیست ژیاردیا لامبلیا، گندنا را گیاهی موثر در از بین بردن کیست‌های ژیاردیا در شرایط آزمایشگاهی معرفی نمودند(3، 29).

در مطالعه حاضر بررسی تأثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت‌های 0/05، 0/1 و 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر بر حسب زمان در مقایسه با داروی مترونیدازول(کنترل مثبت)نشان می‌دهد که با افزایش زمان مجاورت کیست‌های ژیاردیا لامبلیا با نانو ذرات طلا میانگین درصد کشندگی از 56 درصد در 5 دقیقه به 96 درصد در غلظت 0/3 میلی مولار در 180 دقیقه افزایش می‌یابد. در نتیجه نانو ذرات طلا در غلظت موثر(0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر) با افزایش زمان مجاورت(در 180 دقیقه) دارای میزان کشندگی بالایی در مقایسه با دو غلظت دیگر از خود نشان می‌دهد. در سال‌های اخیر مطالعات مختلف در زمینه بررسی خواص ضدانگلی نانو ذرات فلزی مانند نقره و موادی مانند کیتوزان بر روی ژیاردیا لامبلیا به عنوان انگل انسانی در حیوانات آزمایشگاهی توسط محققین صورت گرفته است، به عنوان مثال در بررسی سعید و همکاران بر روی 200 رت، جهت تعیین اثر ذرات نانو نقره و کیتوزان وکرکیومن تحقیقاتی را روی کیست ژیاردیا انجام دادند. در این بررسی ذرات نانو نقره در کنار ذرات نانو کیتوزان اثر کشندگی بیشتری روی کیست ژیاردیا نسبت به نانو نقره و کرکیومن و هم‌چنین کیتوزان و کرکیومن داشت اما نه به طور 100 درصد. رات‌هایی که با مجموع هر سه ماده ذرات نانو نقره و کیتوزان و کرکیومن درمان شدند، به درمان بهتر پاسخ دادند(12). در ایران نیز بعضی از گیاهان دارویی به عنوان داروهای ضد ژیاردیا مانند موسیر آویشن باریک، در غلظت 0/015 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، انبه در غلظت 2/2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معرفی شده‌اند(28). هر چند تاثیر گیاهان دارویی مانند سیر و موسیر و آویشن یا داروهای گیاهی دیگر بر روی کیست ژیاردیا در تحقیقات قبلی گزارش شده است

Archive of SID
www.SID.ir

ولی در مراحل بعدی مطالعات تکمیلی در حیوانات آزمایشگاهی و انسان این مطالعات انجام نشده است.

نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه نانوذرات طلا در غلظت 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر به عنوان یک ترکیب موثر جهت از بین بردن کیست‌های ژیاردیا در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند مورد استفاده قرارگیرد. بنابر این می‌توان از نانو ذرات فلزی مانند طلا نیز در از بین بردن کیست ژیاردیا در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌های موثر جهت استفاده درمانی یا در مطالعات تکمیلی بر روی تروفوزوئیت ژیاردیا لامبلیا یا سایر تک یاخته‌های روده‌ای در حیوانات آزمایشگاهی استفاده کرد. هم‌چنین نتایج مطالعه حاضر می‌تواند جهت یافتن ترکیبی جایگزین در درمان انگل ژیاردیا مورد استفاده قرارگیرد که فاقد معایب داروهای مورد استفاده شیمیایی مانند مترونیدازول به ویژه اثرات جانبی آنها باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران در گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموزیس و معاونت محترم پژوهشی دانشکده داروسازی که امکان اجرایی این مطالعه را فراهم آوردند قدردانی و تشکر به عمل می‌آید. از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران که با تصویب طرح به عنوان پایان نامه(شماره 18-92) با عنوان "بررسی تاثیر نانو ذرات طلا بر روی ژیاردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی" امکان انجام مطالعه را با حمایت و مساعدت مالی فراهم آوردند تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Thompson R, Monis P. Variation in Giardia: Implications for Taxonomy and Epidemiology. Advances in parasitology. 2004;58:69-137.

2- Edrisian G, Rezaeean M, Ghorbani M, Keshavarz M, Mohebali M. Medical protozoalogy. Tehran:University of Medical sciences; 2008. p. 175-6.[Persian]

3- Rahimi-Esboei B, Gholami S, Azadbakht M. Effect of Hydroalcholic extract of Artemisia annua on cysts of Giardia lamblia in Invitro. Mazand Univ Med Sci. 2012; 22(90): 72-80. [Persian]

4- Gholami Sh, Kyanyan H, MobediI, et al. Intesteinal Protozoan Infections in cattle breeders in rural regions of Mazandaran province in 2003. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2005; 45(14):51-60. [Persian]

5- Navarro M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. Coordination Chemistry Reviews. 2009;253(11):1619-26.

6- Saffar M, Ghaffari J, Salimi Sh, Kosariyan M, Khalilian A, Gholami Sh. Recurrent giardial infection in children with non symptomatic giardiasis after treatment with metronidazole. Journal of Mazandaran University of medical Science. 2002; 12(35):60-6. [persion]

7- Torabi N, Mohebali M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Edrissian GH, Esmaeili J, et al. 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. Journal of Pharmaceutical. 2011; 1(1): 13-6.

8- Abdi YA. Handbook of drugs for tropical parasitic infections: CRC Press; 1995.

9- Falagas ME, Walker AM, Jick H, Ruthazer R, Griffith J, Snydman DR. Late incidence of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study. Clinical infectious diseases. 1998;26(2):384-8.

Archive of SID

www.SID.ir

10- Edwards DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1993;31(1):9-20.
11- Upcroft J, Upcroft P, Boreham P. Drug resistance in Giardia intestinalis. International journal for parasitology. 1990;20(4):489-96.
12- Said D, ElSamad L, Gohar Y. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. Parasitology research. 2012;111(2):545-54.
13- Honary S, Gharaei-Fathabad E, Paji ZK, Eslamifar M. A Novel Biological Synthesis of Gold Nanoparticle by Enterobacteriaceae Family. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2013;11(6):887-91.
14- Honary S, Gharaei-Fathabad E, Barabadi H, Naghibi F. Fungus-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. Journal of nanoscience and nanotechnology. 2013;13(2):1427-30.
15- Alizadeh H, Salouti M, Shapouri R, Abdollahzadeh P, Nasseryan J. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Brucella melitensis 16M in an animal model in Vitro. Arak Medical University Journal. 2012;14(7):64-70.
16- Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. Chemical Society Reviews. 2009;38(6):1759-82.
17- Reddy VR. Gold nanoparticles: synthesis and applications. Synlett. 2006;2006(11):1791-2.
18- Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, et al. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. Clinical cancer research. 2005;11(9):3530-4.
19- Navarro M, Pérez H, Sánchez-Delgado RA. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 3. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of the new gold-chloroquine complex [Au (PPh3)(CQ)] PF6. Journal of medicinal chemistry. 1997;40(12):1937-9.
20- Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, et al.

Amelioration of collagen-induced

arthritis in rats by nanogold. Arthritis & Rheumatism. 2007;56(2):544-54.
21- Syed MA, Bokhari S. Gold nanoparticle based microbial detection and identification. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2011;7(2):229-37.
22- Blanke CH, Naisabha GB, Balema MB, Mbaruku GM, Heide L, Müller MS. Herba Artemisiae annuae tea preparation compared to sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in adults: a randomized double-blind clinical trial. Tropical doctor. 2008;38(2):113-6.
23- Azadbakht M, Sajadi S, Rostami J. Giardiacidal activity of the express obtained from bulbs of three Allium species on Giardia intestinalis cysts. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2003; 3:184-8.[Persian]
24- Shahabi S, Ayazi Roozbehani F, Kamalinejad M, Abadi A. Anti-giardia activity of Carum copticum on Giardia lamblia cysts in vitro. Pejouhesh. 2008;32(4):303-7.
25- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Bahramian F, Bekhradnia AR. Antioxidant and free radical scavenging activity of H. officinalis L. var. angustifolius, V. odorata, B. hyrcana and C. speciosum. Pak J Pharm Sci. 2010;23(1):29-34.

Archive of SID

www.SID.ir

26- Azadbakht M, Azadbakht MS. Five prevalent antiprotozoal herbal drugs. J Mazandaran Univ Med Sci. 2008; 18(67):118-32. [Persian]
27- SafarHarandi M, Dalimi A, Ghafari F. The effect of Allium Sativum on Giardia lamblia and Giardia muris Invivo and Invitro. Hakim Journal. 2007; 9 (3): 58-64.[Persian]
28- Sadjjadi SM, Rostami J, Azadbakht M. Giardiacidal activity of lemon juice, vinifer and vinegar on Giardia intestinalis cysts. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2006; ; 37(3): 24-7.
29- Gholami Sh, Rahimi-esboei B, Azadbakht M, Ziaee H. In Vitro effectiveness of Hydroalcholic Chloroformic extracts from leaves of Allium paradoxum against Cysts of Giardia lamblia. 1st International and 8th National Congress of Parasitology & Parasitic Diseases in Iran. Iran, Kerman.2012.p.96.

Archive of SID

www.SID.ir