Archive of SID

REVIEW ARTICLE

Applications of Nanoscopic Technology in Protozoal Infections

Azar Shokri[1],
Mahdi Fakhar[2],
Javad Akhtari[3],
Pooria Gill[3]

[1] PhD Student in Medical Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center , Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 25, 2015 ; Accepted March 6, 2016)

Abstract

Identification of materials at the nanometer scale using microscope tools or nanoscopy helps in better understanding of cell physiology. It is one of the available methods in evaluating the changes caused by physico-chemical agents. In recent years, nanoscopic tools have developed greatly in ultrastructural studies or diagnostic purposes and drug screening for human protozoan infections including *plasmodium* spp. and *Leishmania* spp. The present study aimed at evaluating the application of nanoscopic technologies in studies carried out on protozoal infections, especially *Leishmania* parasite. A non-systematic review of published articles (1998-2014) was performed in electronic databases as PubMed, Google scholar, Scopus, Magiran, Iranmedex, and Web of Science. The search keywords included STM, AFM, protozoan pathogens, *Leishmania*, and nanotechnology. Our study revealed that nanoscopic technologies and on top of them atomic force microscopy (AFM) are effective and powerful tools for structural distinction of protozoan parasites, particularly *Leishmania*, which could be used alongside old methods such as Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission electron microscopy (TEM).

Keywords: nanotechnology, nanomicroscopy, atomic force microscopy, protozoan, *leishmania*

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(134): 412-429 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

مجـلـــه دانـشـــگاه عـلـــوم پـــزشـکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۴ اسفند سال ۱۳۹۴ (۴۲۹-۴۱۲)

کاربرد های فناوری نانوسکوپی در عفونت های تک یاخته ای

آذر شکری[۱]
مهدی فخار[۲]
جواد اختری[۳] پ
وریا گیل[۳]

چکیده

شناسائی مواد در ابعاد نانومتری توسط میکروسکوپ‌های دقیق یا همان نانوسکوپی، به فهم بهتر فیزیولوژی سلول‌ها منجر شده و یکی از راه‌های موجود برای ارزیابی تغییرات ایجاد شده توسط عوامل فیزیکی و شیمیائی در سطح سلول می‌باشد. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در حوزه نانو، ابزارهای نانوسکوپی برای بررسی خصوصیات فراساختاری، اقدامات تشخیصی و پژوهش‌های دارویی در حوزه انگل‌شناسی، به ویژه تک یاخته‌های بیماری‌زا مانند پلاسمودیوم و لیشمانیا، رشد چشمگیری داشته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی کاربردهای فناوری نانوسکوپی در مطالعات انجام شده بر روی عفونت‌های تک یاخته‌ای با تأکید بر انگل لیشمانیا انجام گرفته است. در این مطالعه که از نوع مروری غیر نظام‌مند می‌باشد، جستجو با کلید واژه های نانوسکوپی، AFM, STM، تک یاخته‌های پاتوژن، لیشمانیا، نانوتکنولوژی، به‌صورت تکی و ترکیبی در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed,GoogleScholar, Scopus ,Magiran ,Iranmedex ,Web of Science در یک بازه زمانی از سال ۱۹۸۸ تا سال ۲۰۱۴ انجام شد و مقالات مرتبط با موضوع، انتخاب و بررسی شدند. این بررسی نشان داد که فناوری‌های نانوسکوپی به ویژه میکروسکوپ نیروی اتمی Atomic Force Microscopy (AFM)، ابزار قدرتمند و کارآمد در تشخیص دقیق جزییات فراساختاری تک یاخته‌ها به ویژه انگل لیشمانیا می‌باشند. لذا از این روش‌ها می‌توان به عنوان روش‌های تکمیلی در کنار روش‌های قدیمی میکروسکوپ الکترونی مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و عبوری (TEM) استفاده نمود.

واژه های کلیدی: نانوتکنولوژی، نانوسکوپی، AFM، تک یاخته، لیشمانیا

مقدمه

پیشرفت در دانش نوین بدون وجود لوازم قابل اعتماد جهت شناسائی خصوصیات ساختاری، فیزیکی و شیمیائی مواد در ابعاد میکرونانو در سطح اتمی غیرممکن است(۱). استفاده از پرتوهای نوری در بررسی مواد زیستی و مهندسی، سابقه‌ای بسیار طولانی دارد. از نظر تاریخی، دلیل روی آوردن به استفاده از الکترون‌ها را باید در محدودیت حد تفکیک تصاویر در میکروسکوپ‌های نوری دانست. این محدودیت به دلیل اندازه‌ی طول موج پرتوهای نور مرئی ایجاد می‌شود، زیرا طبق قوانین فیزیک، نمی‌توان به حد تفکیک کم‌تر از نصف طول موج نور (مرئی) یعنی ۲۰۰ نانومتر رسید. با استفاده از باریکه الکترونی به جای نور، این محدودیت برطرف

مولف مسئول: مهدی فخار– ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاه پیامبراعظم، داشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
۱. دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، کمیته تحقیقات دانشجویی. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکزتحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۲/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۲/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۲/۱۶

www.SID.ir

Archive of SID

شـد کـه ظهـور میکروسـکوپ الکترونـی عبـوری (Transmission electron Microscope) و میکروسکوپ الکترونـی روبشـی (Scanning electron Microscope) را شاهد بودیم و تکنیک های جدیدتر روبشـی در حـال پیشـرفت اسـت(۲). شـناخت مـواد در ابعـاد نـانومتری بـا بهره‌گیری از روش‌های نـوین میکروسـکوپی، منجـر بـه پیدایش شاخه جدیدی بـه نـام نانوسـکوپی شـده اسـت. لغت نانو از ریشه یونانی dwarf به معنای کوتولـه گرفتـه شده و به عنوان یـک پیشـوند، کـاربرد زیـادی در علـوم مختلف پیدا نموده است. ایـن حـوزه بـا توانـائی سـاخت ذراتی به قطر ۱-۱۰۰ نـانومتر و بـا هـدف سـاخت ذرات جدیـد بـا خـواص و عملکردهـای متفـاوت، معرفـی گردید(۳). خواص نانومکانیکی و نیروهای در ابعـاد نـانو که منتج از ریزمحیط سلولی (Microenvironment) می باشـند، تـأثیر قابـل تـوجهی بـر فیزیولـوژی و عملکـرد سلول‌ها و ارگانیسم‌های زنده دارند. امروزه معلـوم شـده است که سلول‌ها قادر به پاسخ‌دهی به گسـتره وسـیعی از علائم نانومکانیکی ریزمحیط خود می‌باشند. سیگنال‌های فیزیکی و بیوشیمیائی فراوانی در زمان سلامتی و بیماری سلول‌ها ایجاد می‌گردند. نه تنها سـلول‌هـای پسـتانداران، بلکه سلول‌های گیـاهی و حتـی سـلول‌هـای میکروبـی و قارچ‌ها، بـه فشـارهای نانومکـانیکی عکـس‌العمـل نشـان می‌دهند و این پاسخ ها برای عملکرد فیزیولوژیک آن‌ها ضروری است(۴). این عکس‌العمـل بـه طـور روشـنی در محدوده سلولی وجود دارد و مبین آن است کـه عوامـل فیزیکی، نقش اساسی در تنظیم و تعدیل مراحل بیولوژیـک سلول‌ها دارند. ریزمحیط سلولی، ساختار پیچیده‌ای دارد که در آن سلول‌ها توسط شبکه‌هـای فضـائی متنـوعی از مولکـول‌هـای زیسـتی، پـروتئین‌هـا و مایعـات محصـور شده‌اند. در این محیط، سلول‌هـا توسـط مکانیسـم‌هـایی، خواص فیزیکی و نیروهای مکانیکی محیط پیرامون خود را احساس می نمایند.

انـدکی پـس از اختـراع میکروسـکوپ نـوری و در مشاهدات اولیه سلول های زنده، مشخص شـده بـود کـه سلول‌ها، قابلیت ذاتی درک و پاسخ‌دهـی بـه تحریکـات نانومکـانیکی را دارا مـی‌باشـند. پیشـرفت‌هـای اخیـر در حوزه میکرونانو، درک مکانیسم‌های مولکولی که باعث واکنش سلول‌ها به عوامل مکانیکی مـی‌گـردد را ممکـن ساخته است. به علاوه، راه را بـرای مطالعـه ایـن عوامـل، هموار نموده است. در حال حاضر، ابزارهای بیـوفیزیکی بسیار کمی برای اندازه‌گیری مستقیم خصوصیات مکـانیکی و دینامیک سلول‌های زنده در ابعاد نـانو و نیـز شناسـایی پروتئین‌های سطحی سلول‌ها در حد تک مولکول وجود دارد. کاربرد نانوذرات در علوم مختلفی هم‌چون فیزیک و شیمی و متالورژی، شاخه‌های جدیـدی از علـوم را ایجـاد کرده است. دانـش پزشـکی هـم در ایـن زمینـه بـی‌بهـره نمانده و بـدین ترتیـب، نانومدیسـین (Nanomedecine) پایه‌گذاری شده است. البته حوزه نانوپزشکی بسیار فراتر از کاربرد نانوذرات می باشد. در حالی‌کـه نانومدیسـین، قادر به ایجـاد تغییـر در درمـان‌هـای پزشـکی مـی‌باشـد، پیچیدگی‌های انسان و سایر ارگانیسـم‌هـا، ایـن حـوزه از علم را به چالشی بحث بر انگیز مبدل نموده است. در حال حاضر، این حوزه تاثیر زیادی بر تحقیقات زیست پزشکی با استفاده از روش‌های تجربی جدید در مطالعـات بـرون تنی دارد(۵،۶). این تکنولوژی گام‌های مـوثری در شناسـائی بهتـر عوامـل عفـونی و انگلـی ماننـد سـالمونلا، لیسـتریا، توبرکلوزیس، HIV و هم‌چنین انگل‌های مالاریـا و لیشـمانیا و تحقیقات مربوط بـه سـاخت واکسـن آن‌هـا بـر داشـته است. میکروسکوپ‌های فلوئورسانس و الکترونی شامل TEM, SEM, STM, AFM و SNOM، منجر بـه شـناخت بهتر ساختار سلول‌ها و ارگانیسم‌های زنده در محیط‌های بیولوژیک و واکنش آن‌ها بـه تغییـرات فیزیکوشـیمیائی محـیط پیرامونشـان شـده اسـت. اطلاعـات سـاختاری از طریق روش‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری یا همان TEM و میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM، حاصل می‌شود. SEM یکی از پرکـاربردترین ابزارهـا در زمینـه بررسـی مورفولـوژی میکروسـکوپی و آنـالیز ترکیـب شیمیائی مواد می‌باشد. میکروسکوپ تونـل‌زنـی روبشـی

www.SID.ir

Archive of SID

(Scanning Tunneling Microscopy-STM) اولـین وسیله برای تهیه تصـاویر در فواصـل حقیقـی سـطوح بـا وضوح اتمی می‌باشد و پس از آن میکروسکوپ نیـروی اتمی (Atomic Force Microscopy- AFM) کـه قـادر بـه ترسـیم انـواع نیروهـا ماننـد نیروهـای مغناطیسـی و الکترواستاتیک می باشد و برهم کـنش‌هـای شـیمیائی را جستجو می نماید، قرار می‌گیرد. ابزارهای نانوسکوپی به کار گرفته شده در حوزه انگل شناسی ماننـد روش‌هـای اسپکتروسکوپی و میکروسکوپی جدید و در رأس آن‌ها اخیراً AFM، امکان بررسی تغییرات فراساختاری تعـدادی از انگل‌ها تحت تاثیر این عوامل را به سهولت امکان‌پذیر نموده است. مشاهده تأثیر نانوذرات با کمک ایـن روش میکروسکوپی، به پیشـرفت‌هـای قابـل تـوجهی در زمینـه بیولوژی انگل‌ها منجر شده و مسیر مقابلـه بـا انگـل‌هـا را هموارتر از پیش نمـوده اسـت. مطالعـه حاضـر بـا هـدف بررسـی کاربردهـای فنـاوری نانوسـکوپی در مطالعـات انجام شده بر روی تک یاختـه‌هـای انگلـی بـا تأکیـد بـر انگل لیشمانیا انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعـه کـه از نـوع مـروری غیـر نظـام منـد می‌باشد، جستجو با کلید واژه‌هـای نانوسـکوپی، AFM، STM، تک یاخته‌های پاتوژن، لیشمانیا، روش تشخیص، نانوتکنولوژی و لیشمانیازیس، به صورت تکی و ترکیبی در پایگاه‌هـای اطلاعـاتی PubMed، Google scholar، Scopus، Magiran، Iranmedex، Web of Science در یک بازه زمانی از سال ۱۹۸۸ تا سال ۲۰۱۴ انجام شـده و مقالات مرتبط با موضوع، انتخاب و مطالعه شدند.

اساس تصویربرداری با فلوئورسانس نانوسکوپی

نانوسـکوپی نـوری (فلوئورسـانس نانوسـکوپی)، امکان شناسائی عوامل در حد نـانو را بـا کمـک ابـزاری مانند میکروسکوپ فلورسنت فراهم می‌کنـد. ایـن ابـزار وسـیله‌ای بسـیار ارزشـمند در دانـش بیولـوژی بـه علـت توانائی آن در تصویرگیری غیرتهـاجمی از درون سـلول در تمام ابعاد فضائی می‌باشد(۷).

مطالعات اخیر توانائی این تکنیک‌ها را در مشاهده مستقیم سازماندهی پروتئین‌ها، فعل و انفعالات مولکولی تحت سلولی، جنبش‌های ساختاری، پیام‌رسانی لکتریکی و راکندگی پروتئین‌هـای سیتوزولی بـا وضـوح فضـائی بی‌نظیر به نمایش گذاشته است. تکنیک‌هـای تصـویرگیری بـا وضـوح فـوق‌العـاده، شـدیداً وابسـته بـه پـروب‌هـای فلورسنت درخشان همانند رنگ‌های آلی یا پروتئین‌های فلورسنت می‌باشد. اخیراً این روش‌هـا بـه تصـویربرداری سه بعدی سـلول‌هـای زنـده گسـترش یافتـه اسـت و لـذا وضوح فضائی- زمانی بدیعی را به منظور تصـویربرداری از ابعاد ریزسلولی در محدوده چنـد صـد نـانومتر ایجـاد نمـوده اسـت(۹،۸). ایـن مـوارد شـامل تصـویربرداری از پروتئین‌های داخلی غشاء سلول در محیط سـلول‌هـای زنـده بوده و می‌تواند از طریق استراتژی‌های خـاص، بـه یـک مولکول بسط یابد. امروزه میکروسکوپ‌های فلورسـنت پویشی لیزری، هم کانون (Confocal) و مـولتی فوتـون، ابزارهـای اسـتانداردی را در عرصـه تحقیـق بیولـوژی سلولی فراهم کرده‌اند. در مقایسه با تصویربرداری میدان گسـترده (wide-field)، ایـن اسـتراتژی‌هـا عـدم تمرکـز فلورسانس را از طریق برش‌های نوری معین درون نمونه کاهش می‌دهـد. بـا ایـن حـال ایـن کاربردهـای مرسـوم در برطرف نمودن نیـروی چنـد صـد نـانومتری ناشـی از انکسار نوری محدود می‌شـود. ایـن محـدودیت اساسـی وضوح (250 nm~)، مانع از دیـدن ارگانـل‌هـا بـا انـدازه کوچک‌تر از این محـدوده مـی‌گـردد(۹). پیشـرفت‌هـای اخیر منجر به تکنیک‌های جدید این نوع میکروسـکوپی شده و وضوح تصویر در مقیاس نانومتر را بهبود بخشیده است. باید توجه کرد که انکسار نور و تداخل امواج نور بـا بخـش‌هـای نـوری میکروسـکوپ زمینـه دور قابـل پیشـگیری نمـی‌باشـد. بنـابراین در طـی تصـویربرداری، فلورسانس سـاطع شـده بـه شـکل علائـم گسـترده شـده فضائی ثبت می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

در این تکنیک، اتصال فلوروفور به مولکول‌های مورد نظر با آنتی‌بادی نشاندار یا با تغییرات ایجاد شده ژنتیکی، بسیار اختصاصی صورت می‌گیرد و اندازه‌گیری حساس را با حداقل تداخل پس زمینه امکان‌پذیر می‌کند. تا سال‌های اخیر، وضوح میکروسکوپی فلورسانس به دلیل طبیعت نور و طول موج استفاده شده برای تصویربرداری، از نظر تئوری و عملی محدود بود. در حالی که میکروسکوپ‌های هم کانون و مولتی فوتون، برش‌های نوری ایجاد می کردند، نمی‌توانستند بر موانع افتراق غلبه نمایند. این مسئله تا زمان اختراع میکروسکوپ نوری روبشی میدان نزدیک (Scaning Near Field Optical Microscopy- SNOM) ادامه داشت، مفهومی که در سال ۱۹۲۸ پایه‌گذاری و در ۱۹۸۰ ساخته شد. ازنظر قدرت تفکیک، میکروسکوپ‌های نوری دارای یک حد نهایی می‌باشند که به آن "حد تفکیک" گفته می‌شود و محاسبات ریاضی آن حدود ۱۵۰ سال قبل توسط ErnestAbbe انجام شد. این محاسبات می‌گوید که "کوچک ترین شیئی که می‌توان با استفاده از بهترین میکروسکوپ نوری مشاهده کرد، باید از نصف طول موج نوری که برای دیدن آن استفاده می‌شود، بزرگ‌تر باشد." در میکروسکوپ‌های نوری میدان نزدیک، این حد شکسته شده است و می‌توان مستقل از طول موج نور، به درجه تفکیک‌هایی تا ۱۰۰ نانومتر رسید. در این میکروسکوپ، پروب در ارتفاعی در حد چند نانومتر در بالای سطح مورد نظر حرکت می‌کند. پروب در این جا یک فیبر نوری است که به صورت مخروطی درآمده و پوششی از جنس آلومینیم بر روی آن داده شده است. با روشن کردن سطح نمونه در محدوده میدان نزدیک، با استفاده از یک منبع نوری کوچک، تصاویری با درجه تفکیک بسیار بالاتر از محدودیت انکسار نور ایجاد می‌شود. این میکروسکوپ را می‌توان در هر محیطی استفاده کرد، بدون آن که نیاز به انجام فرایند آماده‌سازی خاصی بر روی نمونه باشد. در این روش، سوزن دستگاه با نمونه برخورد نمی‌کند، لذا هیچ گونه خرابی در نمونه به وجود نخواهد آمد. با افزایش نیاز به تصویربرداری بیش‌تر از جزئیات، میکروسکوپ‌ها منجمله میکروسکوپ‌های فلورسنت، تحولات اساسی یافتند. ترکیبات فلورسنت هم همزمان با پیشرفت این میکروسکوپ‌ها، به مرور توسعه پیدا کردند. تقلیل پراکندگی ایجاد شده (Stimulated emission depletion)، مبنایی برای ساخت میکروسکوپی در سال ۱۹۹۴ شد.

این تکنیک اساساً بر محدودیت انکسار نور در میکروسکوپ‌های فلورسنت غلبه کرد. در این تکنیک، دو پرتو لیزری مورد استفاده قرار می‌گیرند که یکی از آن‌ها برای تحریک، به درخشش مولکول‌های فلورسنت و دیگری برای مسدود کردن درخشش فلورسنت های اضافی به کار گرفته می‌شوند. این پرتوها به فاصله نانومتری سطح نمونه را اسکن می‌کنند و تصویری با وضوح بسیار بالا را خلق می‌کنند. در تکنیک دیگر، امکان خاموش و روشن کردن مولکول‌های فلورسنت به وجود آمده است. توانائی تصویربرداری میکروسکوپ فلورسانس در طی چند دهه اخیر، افزایش قابل توجهی یافته است. راه‌کارهای بسیاری برای افزایش وضوح نوری تصویر، منجر به پیدایش نسل جدید میکروسکوپ‌های فلورسانس شده است(۱۰).

اساس تصویربرداری با میکروسکوپ نیروی اتمی

تکنیک AFM در سال ۱۹۸۶، درست چند سال پس از اختراع STM که برای نخستین بار سبب خلق تصاویر سه بعدی با وضوح اتمی شده بود، توسط همان مخترعین به‌وجود آمد(۱۱). اساس این روش تصویربرداری، یک پروب نوک تیز برای نشان دادن خصوصیات سطوح می‌باشد. این پروب با نمونه مورد نظر برای به‌دست آوردن یک تصویر سه بعدی واضح برهم کنش انجام می‌دهد. این خصوصیت مربوط به نوک تیز پروب می باشد. جنس پروب و پایه‌ها (Cantilevers) معمولاً از سلیکون یا نیترید سلیکون است که با تکنیک‌های مخصوصی به نام microfabrication تهیه می شود. این پروب‌ها به یک تراشه شیشه‌ای برای حمل شدن وصل

www.SID.ir

Archive of SID

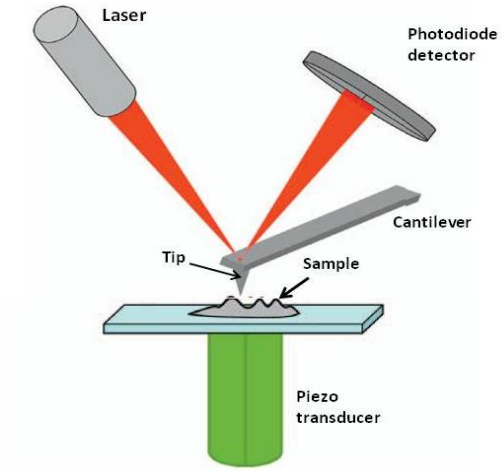
شده‌اند. می‌توان گفت مهم‌ترین بخش AFM، پروب آن است که در واقع بخشی است که با نمونه مستقیماً تماس می‌یابد و این مربوط به خصوصیت نوک پروب و وضعیت قرار گرفتن آن می‌باشد. در واقع AFM به منظور اندازه‌گیری برهم کنش‌های واندروالس یک اتم در انتهای نوک پروب با اتم‌های سطح جامد نمونه طراحی شده است. دومین بخش مهم AFM، مکانیسمی است که نوک پروب را در نزدیکی نمونه قرار داده و سطح نمونه را با دقت بالائی اسکن می‌نماید و برای دستیابی به حداکثر وضوح آن را در بهترین وضعیت نگه می‌دارد. لوله اسکنر پیزو به‌طور گسترده‌ای برای حرکت آسان در سه جهت به‌کار می‌رود و از ماده سخت سرامیکی پیزوالکتریکی با دیواره نازک تشکیل شده که شعاع وار قطبی می‌شود. اسکنر لوله‌ای پیزو، دقت باورنکردنی در ابعاد نانومتری دارد که باعث می‌شود نمونه آنالیز شده در وضعیت مناسبی قرار گیرد(۱۲). AFM نه تنها برای تصویربرداری به کار می‌رود، بلکه جهت اندازه‌گیری نیرو، قابلیت ارتجاع، آب گریزی، بار الکتریکی و نیز برای شناسائی رسپتورها یا لیگاندها و مشخص کردن بعضی از خصوصیات اساسی فیزیکوشیمیائی کاربرد دارد. چندین روش تصویربرداری وجود دارد. انتخاب سبک تصویربرداری توسط مشخصات برهم‌کنش پروب با نمونه انجام می‌شود. یکی از این سبک‌ها، روش تماسی است که استفاده زیادی از آن می‌شود و در آن یک تماس مداوم بین پروب با سطح نمونه درطی اسکن وجود دارد. یکی از احتمالات استفاده از روش تماسی، روش ارتفاع ثابت می‌باشد که در آن انحرافات دسته پروب وقتی نمونه به شکل افقی اسکن می‌شود، ثبت می‌گردد. در این روش، نیروها بر اساس پستی و بلندی نمونه، متغیر خواهند بود. این روش در نمونه‌های زیستی، کم‌تر مفید واقع می‌شود، چرا که نیروهای متغیر به نمونه آسیب می‌زند. در مورد این نمونه‌ها، سبک نیروی ثابت کاراتر می‌باشد. در این سبک، ارتفاع نمونه می‌تواند تنظیم شود تا انحراف دسته پروب از طریق یک لوپ بازخورد ثابت نگه داشته شود. با این روش می‌توان تصویر پستی و بلندی‌های مربوط به زبری سطح نمونه و ضخامت یک لایه معین را به دست آورد. امروزه بیش‌تر از سبک ضربه‌ای (Tapping mode) که به نام روش تماس مداوم نیز شناخته می‌شود، به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود که در آن دسته پروب توسط یک نوسان ساز الکتریکی، مادام که سطح را اسکن می‌کند، با تناوبی نزدیک به تناوب رزونانس خود، تهییج و مرتعش می‌گردد. این روش نیروهای جانبی را که به راحتی به ساختارهای ظریف موجود در سطح مورد آزمایش آسیب می‌رسانند، حذف می‌کند. سبک ضربه‌ای، نه تنها سیگنال‌های انحرافی و مکانی را ثبت می‌نماید، بلکه تفاوت‌های مرحله تأخیری در طی اسکن را به دست می آورد و سبک تصویربرداری مرحله‌ای را شکل می‌دهد. نوسان نوک پروب که توسط نوسان ساز الکتریکی ایجاد شده، پس از تماس نوک پروب با سطح نمونه، فروکش می کند. این تماس، تأخیر فاز ناشی از اثر ویسکوالاستیک، چسبندگی و مکان نگاری نمونه که باعث تفاوت متقابل شده است را به تعویق می‌اندازد.

برای آنالیز سطح تک یاخته‌ها، سبک تماس متناوب ارجحیت دارد، چون به طور مؤثری ایجاد خراش روی سطح نمونه را در مقایسه با سبک اسکن تماسی کاهش می‌دهد. درمجموع مزیت مهم، امکان استفاده از پروب‌های مختلف برای اسکن کردن سطح می‌باشد. AFM می‌تواند همراه با Force Spectroscopy برای اندازه‌گیری نیروهای برهم کنش بین پروب و نمونه استفاده شود. اساساً Force Spectroscopy ثبت انحراف پروب در طی دوره فشردگی و انبساط کریستال پیزوالکتریک است که وضعیت عمودی پروب را کنترل می نماید(۱۲) (تصاویر شماره ۱ و ۲).

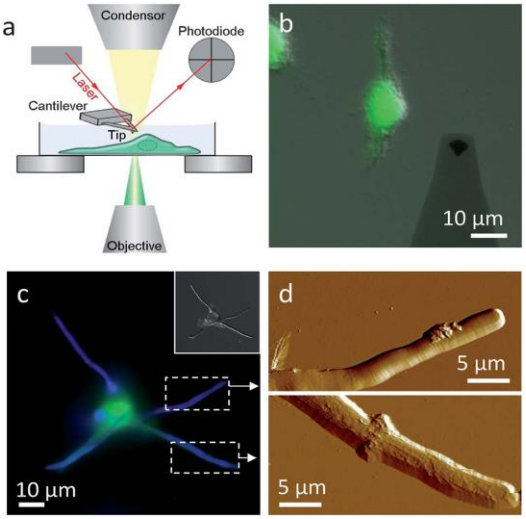
در روش AFM، علاوه بر این که نمونه ها نیاز به آماده سازی چندانی ندارند، تصویر سه بعدی از نمونه در مقیاس نانومتر ایجاد می‌شود و چون امکان مطالعه مولکول‌های زیستی و سلول ها در محیط فیزیولوژیک

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۱: بخش‌های اصلی یک میکروسکوپ نیروی اتمی(AFM) یک لیزر که به وسیله cantilever به یک دکتور فتودیود می تابد. (ii) cantilever که یک نوک (tip) برای اسکن کردن نمونه دارد. (iii) یک مبدل پیزو که نمونه را در جهات X-Y-Z حرکت می دهد (۱۲).



تصویر شماره ۲: اصول تصویربرداری با AFM و کاربرد آن در تصویربرداری از برهم کنش ماکروفاژ و یک پاتوژن. (a) تصویربرداری در مقیاس نانو ترکیبی از توانائی پیشرفته AFM با میکروسکوپ نوری. (b) تصویر میکروسکوپ نوری که کانتیلور AFM را همراه با ماکروفاژ زنده بر روی شیشه نشان می دهد که با رنگ سبز رنگ آمیزی شده است. (c) تصویر فلوئورسانس ماکروفاژ سبز رنگ که ۳ ساعت با سلول قارچ پاتوژن کاندیدیا آلبیکانس (آبی رنگ) انکوبه نموده اند. .(d) دو تصویر بزرگ شده از نواحی نقطه چین شده نشان داده شده در تصویر فلوئورسانس. آن ها تفاوت های ساختاری بزرگ بین دو رشته را یکی داخل شده (پائین تصویر) و دیگری خارج شده (بالا) را نشان می دهد(۱).

آن‌ها وجود دارد، لذا بسیاری از وقایع بیولوژیک فعال را در زمان وقوع می‌توان مطالعه نمود. در اصل روش AFM راهی برای مطالعه مولکول‌های زیستی می‌باشد. به‌عبارتی در این تکنیک، تصاویر با وضوح نانومتر از سلول‌های زنده در محیط‌های مایع یا گازی ایجاد می‌گردد و این به خصوص در مورد مواد بیولوژیک و سلول‌ها حائز اهمیت است. این بدان معنی است که سلول‌ها حتی در محیط کشت توسط AFM می‌توانند مورد بررسی قرار گیرند. در این تکنیک هم از سلول‌های زنده و هم سلول‌های ثابت شده می‌توان تصویربرداری نمود و روشی کاملاً مناسب برای بررسی تک یاخته‌های انگلی می‌باشد(۱۲). هرچند مطالعات محدودی در نقاط مختلف جهان در مورد استفاده از روش‌های نانوسکوپی از جمله AFM درحیطه تک یاخته‌های انگلی انجام شده است(۱۳)، ولی بر اساس منابع موجود، تاکنون در ایران از این روش برای بررسی خصوصیات فراساختاری تک یاخته‌ها استفاده نشده است و امید است این روش گسترش قابل ملاحظه‌ای در این زمینه بیابد. در جدول شماره ۱، نمونه‌هائی از مطالعات انجام شده با تکنیک‌های نانوسکوپی آورده شده است(۱۲،۱۱ و۲۹-۱۴).

اساس تصویربرداری با میکروسکوپ تونلی- روبشی

اولین بار STM توسط دو دانشمند به نام‌های Binnig و Rohrer اختراع شد و این دو نفر به علاوه دو تن از همکارانشان به نام‌های Gerber , Weibel آن را تکمیل نموده و راه‌اندازی کردند. این کار منجر به دریافت جایزه نوبل فیزیک توسط مخترعین در سال ۱۹۸۶ شد.

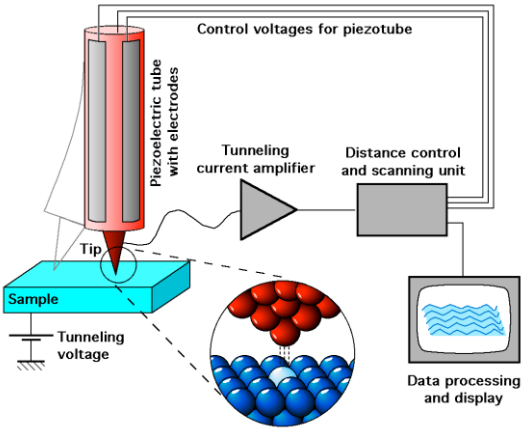
تصویر شماره ۳، بخش‌های اساسی این میکروسکوپ را نشان می‌دهد. اساس کار، قرارگرفتن نوک فلزی پروب نزدیک سطح رسانای یک ماده است که باعث می‌شود الکترون‌ها از نوک پروب به سطح نمونه و بالعکس آن به جریان در آیند (تونل بزنند) و چون این جریان بستگی به فاصله دارد، در صورت ثابت بودن جریان و اندازه‌گیری ارتفاع نوک پروب، خطوط کناره نما ترسیم می‌شود. بدین طریق وضوح اتمی حاصل می‌گردد(۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱: مطالعات انجام شده بر روی برخی تک یاخته ها با فناوری نانوسکوپی

منبع	سلول مورد مطالعه	مورد تحقیق	سال	روش کار	نویسنده
۱۴	Leishmania amazonensis, Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondii	بررسی شارژ سطحی سلول انگل در زمان اتصال آن به سلول میزبان	۲۰۰۱	AFM Spectroscopy	Akaki M et al
۱۵	Leishmania donovani	بررسی اثر نانوAndrographolide (ترکیب گیاهی به شکل نانو) بر روی انگل	۲۰۱۰	AFM	Roy P et al
۱۶	Leishmania	بررسی و شناسائی انگل های تریپانوزوماتیده با کمک DNA میتوکندریائی	۲۰۱۰	AFM and SEM	Cavalcanti D.P et al
۱۷	Trypanosoma cruzi, Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii	تصویربرداری از مراحل مختلف اتصال انگل به سلول ها، تصویر ساختارهای درونی ارگانیسم و تأثیر داروها بر تغییر انگل	۲۰۱۱	AFM	de SouzaW et al
۱۱	Trypanosoma brucei, Herpetomonas megaseliae, Crithidia. Deanei, Giardia lamblia, Trichomonas foetus	تصویربرداری از مراحل مختلف تکامل انگل، ساختار انگل ها و تاژک ها در گونه های مختلف انگل های تاژکدار	۲۰۱۰	AFM and spectoroscopy	Rocha G.M et al
۱۲	Leishmania infantum	بررسی تأثیر پپتید DRS01 ضد میکروبی بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا اینفانتوم	۲۰۱۳	AFM and SEM	Eaton P et al
۱۸	Leishmania garnhami	تصویربرداری از مراحل اتصال انگل لیشمانیا به سلول ماکروفاژ میزبان و بررسی برهم کنش انگل های درون سلولی و ماکروفازهای میزبان	۲۰۰۴	AFM	de Yarbuh L et al
۱۹	Leishmania donovani	بررسی تأثیر دارو بر انگل	۲۰۱۳	AFM and TEM	Mondal S et al
۲۰	Leishmania, Toxoplasma gondii, Plasmodium falciparum	بررسی اثر داروها با ساختار نانو بر انگل و نیز بررسی واکسن های طراحی شده بر اساس نانوبیوساینس	۲۰۱۲		Bhardwaj R et al
۲۱	Trypanosoma, Leishmania, Plasmodium	استفاده از نانو ذرات طلا در شناسائی و تشخیص آزمایشگاهی ارگانیسم ها	۲۰۱۳	EM	de Almeida M.P et al
۲۲	Leishmania tropica	استفاده از نانو ذرات نقره در محیط کشت لیشمانیا و ردیابی آن با اسپکترومتری و SEM	۲۰۱۳	SEM	Abdulsadah A. et al
۲۳	Leishmania donovani	بررسی برهم کنش DNA کینتوپلاستی (kDNA) و اکتین ترکیبی انگل لیشمانیا (rLdACT)	۲۰۱۰	AFM	KapoorP, et al
۲۴	Plasmodium falciparum	بررسی ساختار و "knobs" شارژ ناب ها در گلبول های قرمز آلوده به انگل پلاسمودیوم	۱۹۹۶	AFM,Surface potential spectroscopy	Aikawa M, et al
۲۵	Leishmania donovani	شناسائی مولکول های لیپوفسفوگلیکان (LPG) در انگل لیشمانیا	۲۰۰۳	AFM	Julie A, et al
۲۶	Leishmania tarentolae	بررسی ساختار DNA کینتوپلاستی (kDNA)	۱۹۷۷	EM	Englund PT, et al
۲۷	Leishmania major	بررسی مرفولوژی انگل در بخش های مختلف دستگاه گوارش پشه خاکی	۱۹۸۶	SEM	Warburg A, et al
۲۸	Hymenolepis nana	بررسی تاثیر داروی ضد کرم پرازیکوانتل بر روی سستود همینولیس نانا	۱۹۸۰	SEM , TEM	Becker B et al
۲۹	Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis Spironucleus muris	بررسی تغییرات ساختاری انگل در مواجهه با داروهای آلبندازول و مترونیدازول	۱۹۹۴	TEM	Oxberry Me, et al



تصویر شماره ۳: بخش های اساسی STM. این بخش ها شامل: ۱- نوک فلزی، ۲- اسکنر پیزوالکتریک، ۳- تقویت کننده جریان (nA)، ۴- bipotentiostat (bias)، ۵- لوپ فیدبک (جریان)

نکته مهم این است که نوک پروب (Tip) باید رسانا (فلزی) باشد. اساس کار این میکروسکوپ بدین‌شکل است که خارجی‌ترین اتم نوک پروب با نزدیک‌ترین اتم روی نمونه ارتباط برقرار می‌کند؛ لذا تیز بودن نوک پروب الزامی نیست، بر عکس روش AFM که ارتباط فضائی (سه بعدی)، از الزامات و ضروریات می‌باشد. عواملی که بر روی وضوح تصویر با STM تأثیر گذارند، مواج بودن تصویر است و بسته به این که تراکم اتم‌های سطح نمونه چگونه در ارتفاع بالای سطح، تغییر می‌کند، وضوح تصویر نیز تغییر می‌نماید. دیگر این‌که STM مستقیماً وضعیت استقرار هسته را ردیابی نمی‌کند، بلکه بیش‌تر ردیاب تراکم اتمی می‌باشد، به همین دلیل تصاویر گرفته شده وضعیت قرار گرفتن اتم‌ها را نشان نمی‌دهد. تصویربرداری STM به خصوصیت سطح و بزرگی و وجود جریان تونلینگ بستگی دارد. از آن‌جاکه STM از دورترین اتم سطح نمونه، تصویربرداری می‌نماید، به طور طبیعی نیاز به محیط با خلأ بالا دارد تا از عدم وجود هر نوع آلودگی سطح مثل پوشش مولکول‌های هوا یا

www.SID.ir

Archive of SID

آب، اطمینان حاصل شود. بدین‌ترتیب قادر به تصویربرداری از اتم‌های واحد با وضوح اتمی می‌باشد(۲۲).

مقایسه STM با AFM

STM در واقع برای آنالیز سطحی مواد رسانا با اندازه‌گیری بر هم کنش پروب و سطح ماده استفاده می‌شود، ولی AFM برای آنالیز سطح بسیاری از مواد مانند مواد بیولوژیکی به‌کار می‌رود؛ چرا که نیازی به رسانایی سطح مواد نمی‌باشد. نکته قابل توجهی که در زمینه استفاده از روش STM وجود دارد، این است که در آن نیاز به ایجاد خلاء می‌باشد و باعث می‌گردد سلول‌ها در شرایطی دور از وضعیت طبیعی خود، مورد مطالعه قرار گیرند. ایجاد خلاء باعث تغییراتی در سلول زنده می‌گردد و به عنوان مثال کوتاه‌تر از اندازه واقعی خود دیده می‌شود. البته این مشکل از طریق روش‌های فیکس کردن سلول با مواد شیمیائی قابل رفع می‌باشد. یک مزیت قابل توجه روش STM نسبت به روش AFM، قابلیت مطالعه تعداد زیادی سلول در یک زمان می‌باشد که دلیل آن، بزرگ‌تر بودن محدوده دید میکروسکوپی می‌باشد. ازطرفی سرعت بالاتر تصویربرداری نیز مزیت دیگر این روش به شمار می‌آید، هر چند به نظر می‌رسد استفاده توأم از دو روش مذکور، تأثیر برخی مواد بر سطح سلول لیشمانیا را بهتر نمایان می‌نماید(۱۳).

اندازه گیری پتانسیل سطحی

این نوع تصویربرداری که با سبک intermittent contact انجام می‌شود، اجازه ایجاد یک نقشه از پتانسیل الکترواستاتیک از سطح نمونه را می‌دهد. این نقشه بر اساس اختلاف پتانسیل سطح نمونه با پتانسیل نوک پروب ترسیم می‌شود. این نوع تصویربرداری اطلاعات مفیدی در مورد نمونه‌های بیولوژیک می‌دهد. در مورد تک یاخته‌های انگلی، تنها کاری که با این تکنیک انجام شده است، درباره ناب‌های ایجاد شده توسط انگل پلاسمودیوم فالسی پاروم است. برخلاف بقیه، سطح گلبول قرمز با شارژ منفی، ناب‌ها دارای شارژ مثبت در حدود 20+ mV می‌باشند و این می‌تواند علت تمایل به اتصال شدید ناب‌ها به سطح سلول‌های اندوتلیال عروق با شارژ منفی باشد. همین‌طور مروزوئیت‌های انگل در ناحیه رأسی خود دارای شارژ مثبت (65+ mV) می باشند، در حالی که بقیه سلول، دارای شارژ منفی (41.8 mV–) است. جالب آن که، بخشی از انگل که اتصال اولیه با سطح سلول میزبان را ایجاد می‌نماید، دارای شارژ مثبت می‌باشد. مقادیری که برای تاکی زوئیت‌های انگل توکسوپلاسما گوندی، آماستیگوت‌های لیشمانیا آمازونسیس (Leishmania amazonensis)، پروماستیگوت‌های لیشمانیا آمازونسیس و آماستیگوت‌های تریپانوزوما کروزی (Trypanosoma cruzi) اندازه‌گیری شده است، به ترتیب ۹۰+، ۷۰+، ۱۳۰+ و ۳۴۰ میلی ولت می‌باشد. این یافته‌ها، بعدها با الکتروفورز و اتصال ذرات کاتیونی به اثبات رسیدند(۱۷،۱۴).

*- طیف نگاری نیرویی (*Force spectroscopy*)*:

از AFM جهت جستجوی خصوصیات فیزیکی نمونه استفاده می‌شود. یکی از این خصوصیات، قابلیت ارتجاعی است که به جمع‌آوری اطلاعات در مورد سختی سطح سلول کمک می نماید. پیش از این، از این روش در قارچ‌ها استفاده شده است و به‌عنوان مثال در آسپرژیلوس نیدولانس (Aspergillus nidulans) مشخص شده است که نوک رشته‌ها و نیز انتهای شاخه‌ها نسبت به بخش پایه، دارای انعطاف بیش‌تری می‌باشد. با این روش می‌توان غشا را مطالعه کرد و با توجه به وضوح دقیق در ابعاد مولکولی این روش، خصوصیاتی از غشاء مانند قرارگیری رسپتورها را بررسی کرد. این روش تصویرگیری بر اساس نقشه ارتجاعی سلول در مورد سلول‌های آلوده شده با انگل‌های توکسوپلاسما گوندی و تریپانوزوما کروزی با AFM، نشان داده که هر دو انگل به‌طور مشخصی سخت‌تر از سیتوپلاسم سلول محاصره کننده خود هستند. در مورد سلول آلوده به

www.SID.ir

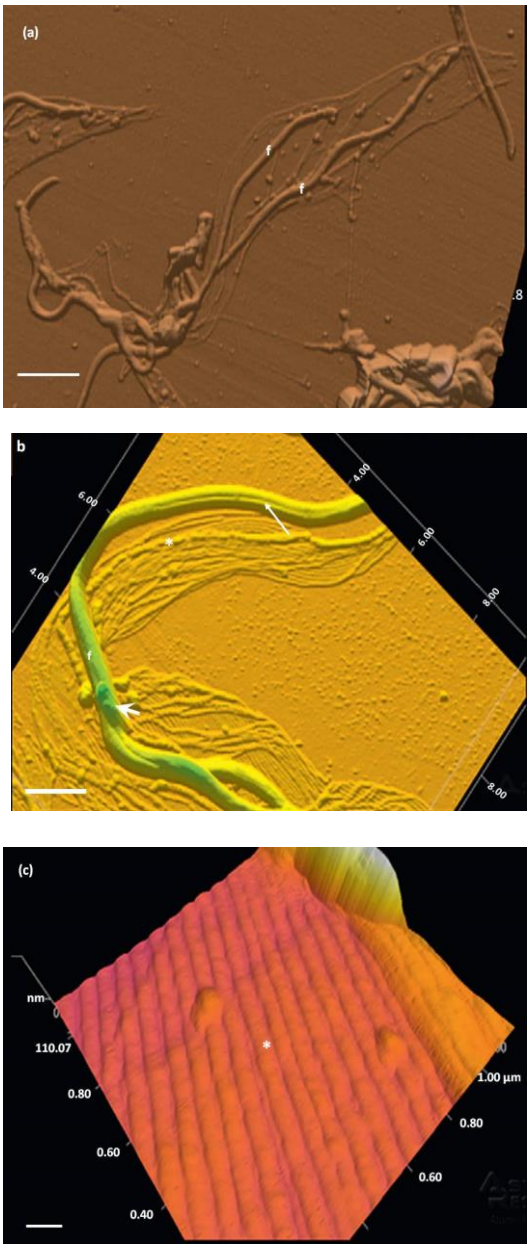
Archive of SID

توکسوپلاسما گوندی، واکوئـل پـارازیتوفوروس دارای سختی کم‌تری نسبت به تـاکی زوئیـت انگـل مـی‌باشـد. روش طیف‌نگاری نیرویی در مورد آنتاموبا هیسـتولیتیکا نشان داده است که برهم کنش شدیدی بین سطح سلول و نوک پوشیده شده با کندروئیتین-۶- سـولفات ایجـاد مـی‌شـود. نیـرو در محـدوده nN۲/۲ انـدازه‌گیـری شـده اسـت. افـزودن گـالاکتوز بـه محـیط، مقـدار نیـروی چسبندگی را کاهش مـی‌دهـد. ایـن بیـانگر بـرهم‌کـنش اختصاصی می‌باشد که احتمـالاً بـه علـت وجـود لکتـین اتصـــالی گـــالاکتوز وان اســـتیل گـــالاکتوز آمـــین (Galactose/N-acetyl-galactosaminelectin) اســـت که بر روی سطح تک یاخته ظاهر می‌شود(۱۷،۱۴).

کاربرد نانوسکوپی در انگل شناسی

- مشاهده سطح تاژک تک یاختـه هـا بـا میکروسـکوپ نیروی اتمی

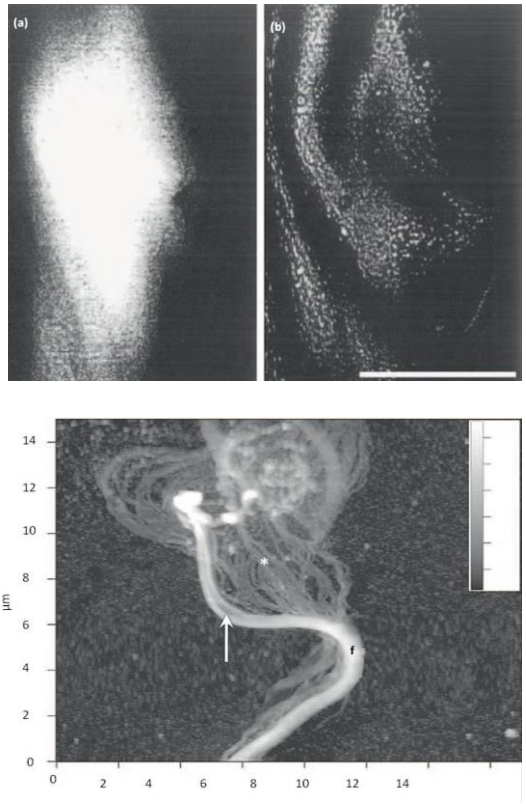
از این تکنیک جهت مطالعه تـک یاختـه‌هـای مهـم انگلی مانند خانواده تریپانوزوما تیده (Trypanosoma tidae) استفاده شده است. در تک یاخته‌هـای انگلـی تاژکـدار، تاژک نقش مهمی در بیماری زائی انگل در بدن میزبـان پستاندار دارد، بنابراین شناخت ساختار تاژک می‌تواند به عنوان اهداف جدید در مداخلات داروئـی مـدنظر قـرار گیـرد. در مطالعـه‌ای، بررسـی فراسـاختاری تریپانوزومـا کروزی، اطلاعات ارزشمندی را درباره سـاختمان دقیـق تـاژک توسـط روش AFM بـه دسـت داد. ایـن روش تصویربرداری، وجود ساختارهایی که قبلاً شناخته نشـده بودند، همانند فضاهای فاصله‌دار که اطراف شیار تـاژک تشکیل می شود و در جهت طول محـور تـاژک بـزرگ بین آگـزونم و paraflagellar rod (PFR)قـرار دارد، را مشخص نمود. هرچند عملکرد و علت وجود آن ها فعلاً نامشخص می‌باشد. تاژکداران مختلف با این روش مورد بررسی قرار گرفتند، ولـی ایـن سـاختار در تمـامی آن‌هـا مشاهده نشد. این نتایج نشـان مـی‌دهنـد کـه وجـود ایـن فضاها در تاژکدارانی که PFR دارند، حتمی می باشـد و بیانگر نقـش عملکـردی آن هـا در تـاژک مـی‌باشـد(۱۰) (تصاویر شماره ۴ و ۵).



تصویر شماره ۴: تصویر تریپانوزوما بروسه ای که به روش AFM و با Intermittent contact mode گرفته شده است. در تصـویر (a)، کـل انگل مشاهده می شود و مراحل آغاز تقسیم سلولی را نشان می دهد و دو تاژک در یک سلول دیده می شـود. در تصـویر (b)، فـلاژل و شکاف داخل آن در طول محور بزرگ دیده می شود و همین طـور اتصال دهنده مشاهده مـی شـود (فلـش بـزرگ تـر). در تصـویر (c)، میکروتوبول های ساب پلیکولار به خوبی با بزرگ نمـائی بـالا قابـل مشاهده است (علامت ستاره). تصاویر در هوا گرفته شده اند. مقیاس 2 mm برای تصاویر (a–b) و 200 nm برای تصویر (c) می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۵: تصاویر فرم اپی ماستیگوت تریپانوزوما کروزی. (a) تصویر گرفته شده با Intermittent contact mode از قسمتی از پیکر تریپانوزوما کروزی. (b) تصویر گرفته شده با Phase mode از همان بخش پیکره انگل. (c) تصویر گرفته شده با Contact mode از سلولی که با دترجنت مجاورت داده شده است. تاژک با شکاف (فلش سفید) در طول محور بزرگ خود. میکروتوبول های ساب پلیکولار (علامت ستاره) و تاژک (f) نیز قابل مشاهده اند. (d) تصویر با Intermittent contactmode از تاژک سلولی که با دترجنت مجاورت داده شده است که در آن شکاف در امتداد محور بلند تاژک به خوبی مشاهده می شود با فرورفتگی ها سازمان یافته (نوک فلش ها). ساختار paraflagellar rod نیز قابل مشاهده است (فلش سفید). تصاویر با intermittent contact mode و در مجاورت هوا گرفته شده اند. علامت بار بیانگر 1 mm برای دو تصویر (a) و (b) می باشد.

اهمیت تکنولوژی‌های نوین در شناسائی تک یاخته ها:

لیشمانیوز پوستی یکی از بیماری‌های انگلی است که توسط تک یاخته جنس لیشمانیا (Leishmania) ایجاد می‌شود و بسته به گونه‌های آن و پاسخ ایمنی میزبان، اشکال بالینی مختلفی ایجاد می کند. این بیماری گسترش جهانی دارد و بیش‌تر در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان و کشورهای حوزه مدیترانه شایع است(۳۱،۳۰). در تشخیص آزمایشگاهی این انگل، از روش‌های متفاوتی استفاده شده است که هم اکنون نیز رواج دارد و بیش‌تر مبتنی بر روش‌های تشخیص مستقیم انگل با استفاده از میکروسکوپ نوری در بافت‌ها و احشاء مبتلایان می‌باشد و نیز روش کشت و روش‌های مولکولی شناسائی انگل در بافت‌های مختلف مبتلایان که در کنار روش مستقیم ارزشی بسیار داشته و در مواردی بر آن ارجحیت داده می‌شود(۳۳،۳۲). ساده‌ترین و کم هزینه‌ترین روش، مشاهده مستقیم انگل در بافت‌های مختلف می‌باشد(۳۵،۳۴) و هنوز هم به عنوان روش استاندارد شناسائی انگل مورد قبول جامعه علمی آزمایشگاهی است و حتی دربسیاری از تحقیقات و مطالعات علمی، از این روش معتبر استفاده می گردد. ابزار کارآمد دیگر، استفاده از میکروسکوپ‌های فلئورسنت و الکترونی در تشخیص انگل‌ها، مخصوصاً تک‌یاخته‌های انگلی می‌باشد. جدیدترین شیوه، استفاده از AFM و تمامی سبک‌های وابسته به آن می‌باشد. به‌طور خلاصه با این تکنیک می‌توان به نتایج آنالیز مواردی مانند: ساختار تک‌یاخته‌ها به شکل دست‌نخورده و یا استخراج شده توسط دترجنت‌ها، سطح سلول عفونی شده، ساختار ماکرومولکول‌های انگل‌ها، اندازه‌گیری پتانسیل سطحی، اندازه‌گیری انعطاف‌پذیری سلول و برهم کنش لیگاند- رسپتور دست یافت(۲۴،۱۷).

*- مشاهده ناب ها (تکمه های) پلاسمودیوم فالسیپاروم (**Plasmodium falciparum**) در گلبول های قرمز با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی*

با استفاده از AFM، به اثبات وجود دو زیر واحد

www.SID.ir

Archive of SID

در ناب‌ها که مسئول اتصال انگل پلاسمودیوم به دیواره عروق خونی بوده و مالاریای مغزی را ایجاد می‌نماید، پرداخته شده است. تا قبل از این، تصور می‌شد ناب‌ها یک واحد بوده و به اتصال انگل به دیواره عروق خونی کمک می‌نماید. از طریق تکنیک AFM، اندازه‌گیری شارژ سطحی ناب‌های ایجاد شده در عفونت پلاسمودیوم فالسی پاروم، امکان پذیر شده و ثابت می‌کند که علت اتصال انگل به دیواره عروق، شارژ مثبت ناب‌ها در مقابل شارژ منفی دیواره عروق می‌باشد. در همین راستا، تأثیر داروها و مواد شیمیائی مختلف بر انگل لیشمانیا به طور موفقیت‌آمیزی بررسی شده است. با این روش میکروسکوپی، کوچک‌ترین تغییرات سطح سلول به خوبی نمایان می‌شود که شامل تغییرات ایجاد شده در اثر دارو نیز می‌باشد. هم‌چنین از طریق تصاویر گرفته شده از تاژک انگل تریپانوزوما، ساختار جدیدی که قبلاً در تاژک قابل مشاهده نبود، آشکار شده است و ساختار دقیق پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا و تغییرات متأثر از دارو بر این انگل مطالعه شده است(۲۴). هم‌چنین با بهره‌گیری از روش میکروسکوپی AFM، مشاهده تغییرات بسیار کوچک در سطح سلول همانند شکل‌گیری و اتصال مولکول‌های اکتین لیشمانیا (Leishmania actin- LdACT) و برهم‌کنش آن‌ها با توپوایزومراز قابل پی‌گیری و مشاهده شده است.

- مشاهده نحوه ی اتصال اکتین لیشمانیایی به شکاف‌های kDNA با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

اکتین لیشمانیا (LdACT) شکل غیرمعمول اکتین سلول‌های یوکاریوتیک بوده و از سایر اکتین‌ها در توانائی تشکیل شکل رشته‌ای در برابر توکسین‌ها و اتصال به دی ان آز ۱ (DNase-1) متمایز می‌گردد، حضور آن در سیتوپلاسم، نواحی قشری، تاژک، هسته و کینتوپلاست، به ارتباط آن با DNA کینتوپلاست (kDNA) اشاره می‌نمایند. مشخص شده است که LdACT ارتباط با kDNA حلقوی در کینتوپلاست لیشمانیا دارد و در شرایط آزمایشگاهی مخصوصاً با DNA اصلی از طریق برهم‌کنش الکترواستاتیک به ناحیه اتصال گیرنده DNase-1 و شکاف بزرگ DNA متصل می‌شود. به علاوه این پروتئین قادر است با هیدرولیز ATP، دو رشته DNA را از هم باز کند و از طریق این فعالیت، حلقه‌های به هم پیوسته کوچک kDNA را به شکل باز تبدیل نماید. در مجموع LdACT به صورت اختصاصی به توپوایزومراز II پرو کاریوتی متصل می‌گردد و خاصیت جداکنندگی خود را نشان می‌دهد و مشخص می‌نماید که LdACT می‌تواند نقش مهمی در تغییر شکل دادن kDNA داشته باشد. بدین‌منظور kDNA را با LdACT انکوبه و پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، تصویربرداری با روش AFM انجام شده و جزئیات اتصال مولکول‌های اکتین لیشمانیا (LdACT) و برهم کنش آن ها با توپوایزومراز به خوبی قابل مشاهده شده است(۲۳).

سنجش حساسیت و مقاومت لیشمانیا دونوانی به نانوذرات آندروگرافولید (Andrographolide) با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

Mondal و همکارانش با استفاده از ابزاری مانند میکروسکوپ‌های فلورسانس، TEM و AFM، به بررسی ساختار نانوذرات سنتز کرده خود و تصویربرداری از اثرات آن‌ها بر روی انگل لیشمانیا دونوانی پرداختند. بدین‌منظور از آندروگرافولید، نانوذره تهیه نموده (AG nanoparticles) و اندازه آن‌ها با (Photon Correlation Spectroscopy-PCS) زتاسایزر (Zetasizer) نانو مشخص گردید. پس از تهیه سوسپانسیونی از این ذرات، آن ها توسط AFM و با روش ضربه‌ای مشاهده گردید. مورفولوژی ذرات و اندازه‌گیری قطر آن‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی منفی و با TM بررسی و میکروگراف آن‌ها ترسیم شد. جهت بررسی مورفولوژی سطح نانوذرات (توپوگرافی سطحی) از روش AFM استفاده شد(۱۹).

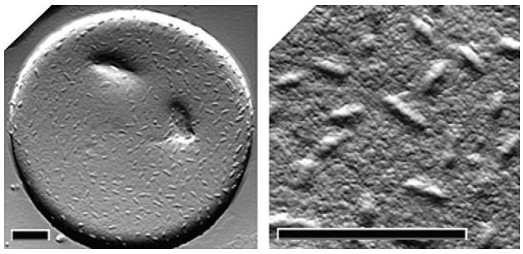
www.SID.ir

Archive of SID

- آنالیز سازماندهی ساختاری تک یاخته های بیماریزا با روش میکروسکوپ نیروی اتمی

de Souza و Rocha به تشریح موارد استفاده از AFM در انگل شناسی پرداخته‌اند. این محققین در مقاله خود مزایای استفاده از این تکنیک در شناسائی سلول‌ها به ویژه تک یاخته‌ها را بررسی کرده‌اند(۱۷). در این مقاله به تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین اشاره شده است، از جمله تشخیص خصوصیات ناب در پلاسمودیوم و نیز بررسی تغییرات ساختاری گلبول‌های آلوده به بابزیا بویس در گاوها (تصویر شماره ۶). هر چندتصاویر گرفته شده به کمک TEM، جزئیات مورفولوژی سطح را در مقایسه با تصاویر گرفته شده با AFM، بهتر نشان می‌دهد، ولی تکنیک AFM امکان آنالیز مراحل برهم‌کنش بابزیا با سلول ها در محیط کشت را فراهم می سازد و در مورد شارژ ایجاد شده در سلول‌های آلوده شده به انگل با استفاده از میکروسکوپی ایمونوفلوروسانس اطلاعات را با جزئیات بیش‌تر از AFM در اختیار قرار می‌دهد. تصویربرداری با تکنیک AFM از دیگر تک یاخته‌های انگلی مانند *Giardia lamblia*, Acanthamoeba spp و Entamoeba histolytica نیز انجام شده، ولی به نظر می‌رسد اطلاعاتی بیش از آن چه قبلاً در مورد جزئیات ساختاری آن‌ها مشخص شده بوده را به دست نداده است. در این مقاله از مشاهده ماکرومولکول‌های سطحی نیز توسط همین روش بحث شده است. آنالیز برهم‌کنش فیلامان های سطحی و پروتئین متصل شونده به کلسیم (calcium-binding protein) آنتاموباهیستولیتیکا (Entamoeba histolytica) توسط تکنیک AFM، امکان پذیر می‌باشد(۱۴).

به علاوه شناسائی ساختار ماکرومولکول ها با این روش امکان‌پذیر شده است، مثلاً این تکنیک آشکار نموده است که نوکلوئید باکتریائی و کروماتین انسانی از فیبرهای مقاوم به دترجنت و نمک با قطر ۳۰-۴۰ نانومتری تشکیل شده‌اند که با هم فیبرهای ضخیم تر با قطر ۷۰- ۸۰ نانومتر را به وجود می‌آورند. مثال جالب دیگر، استفاده از



تصویر شماره ۶: توپوگرافی سطحی گلبول قرمز گاو آلوده شده با بابزیا بویس. بخش (a) گلبول قرمز آلوده به انگل برآمدگی‌های قابل مشاهده در سطح سلول را نشان می‌دهد و (b) بزرگ‌نمائی بیش‌تر همان سلول را در بخش b مورفولوژی با جزئیات بیش تر را نمایش می‌دهد. تصاویر در مجاورت هوا و با contact mode گرفته شده‌اند. دربخش a، مقیاس 1mm و در بخش b، مقیاس 500nm می‌باشد (۳۰).

AFM آنالیز مراحل تجمع خود به‌خود مولکول‌های کلاژن تیپ I در فیبریل‌ها می‌باشد. مثال دیگر، قابلیت مشاهده تحرک FtsZ به شکل برون تنی می‌باشد که اطلاعات جامعی درباره این‌که چگونه این‌مولکول‌های توبولین مانند، ساختارهای پلیمری تشکیل می‌دهند، را ارایه می‌نماید. این ساختارها نقش اساسی در تقسیم باکتری بر عهده دارند. در مورد تک یاخته‌های انگلی، با استفاده از AFM، شناسائی ساختار پروتئین ۳ مربوط به سطح مروزوئیت انگل پلاسمودیوم فالسی پاروم امکان‌پذیر شده است. البته این پروتئین در مخمر نیز وجود دارد و آنالیز شده است و به شکل ساختار رشته‌ای غیرخطی و ناقرینه با برآمدگی‌های تسبیحی وحلقه‌های ارتجاعی وجود دارد که اغلب به عنوان دایمر شناخته می‌شدند. هر چند ساختار منومر و مولتی مرهای بزرگ نیز شناسائی شده‌اند. از AFMجهت شناسائی و آنالیز جزئیات دومین خطی میوزین تیپ II در آکانتاموبا کاستلانی (Acanthamoeba castellani) نیز استفاده شده است. دومین‌های خطی، ساختار رشته‌ای جدیدی ایجاد می‌نمایند که به احتمال زیاد، مستلزم برهم‌کنش سر به دم غیرمعمول هستند(۱۴).

- بررسی نانوذرات آندروگرافیلس و آزادسازی آن به وسیله AFM در تشخیص و درمان لیشمانیوز:

آندروگرافیلد، لاکتون دی ترپنوئیدی است که از

www.SID.ir

Archive of SID

برگ گیاهی به نام paniculataAndrographis به دست می‌آید. این ماده فعالیت ضدلیشمانیائی کمی دارد و ندرتاً به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده دارای نیمه عمر کوتاه پلاسمائی، دسترسی کوتاه زیستی و توزیع نامناسب بافتی می باشد. فرم دادن این ترکیب به صورت نانوذره، تنها گزینه پیش‌رو جهت محلول ساختن آن می‌باشد. بدین منظور این ذرات با poly(DL-lactide-co-glycolic acid) به نسبت ۵۰-۵۰ ترکیب و به نانوذراتی که قدرت ورود به ماکروفاژهای آلوده شده با آماستیگوت‌های انگل را دارند، تبدیل می‌شوند. نانوذرات با کمک تثبیت‌کننده پلی وینیل الکل (PVA) تثبیت می‌شوند. مشخصات فیزیکی و شیمیائی این ذرات توسط طیف سنجی فوتونی، اندازه متوسط ذرات را ۱۷۳nm و پتانسیل زتا آن‌ها را 34.8mV- تعیین نموده است. توسط AFM، شکل کروی و سطح صاف این نانوذرات قابل روئیت شده است. مشخص شده است که این ذرات دارای فعالیت ضد لیشمانیائی با آماده سازی در حضور PVA 4% را دارند (IC50 34 µM) و این در مقایسه با ترکیب خالص آندروگرافیلد دارای اثرات بیش‌تر و با مقداری در حدود یک چهارم ماده خالص می‌باشد (IC50 160 µM). بنابراین نانوذرات آندروگرافیلد، دارای اثر بهتر بوده و می‌تواند در درمان این بیماری انگلی مورد استفاده قرار گیرد(۱۵).

میکروسکوپ الکترونی و AFM ابزاری برای بررسی DNA میتوکندریائی در تک یاخته های خانواده تریپانوزوماتیده

انگل‌های خانواده تریپانوزوماتیده و جنس‌های لیشمانیا و تریپانوزوما، مسئول بیماری‌های مهمی خصوصاً در نواحی گرمسیری دنیا می‌باشند. DNA کینتوپلاستی (kDNA) این خانواده پیچیده‌ترین و غیرمعمول ترین DNA خارج هسته‌ای است که در طبیعت یافت می‌شود و متشکل از مولکول های حلقوی فشرده ای می باشد که تشکیل شبکه ای را درون بخشی از میتوکندری به نام کینتوپلاست می‌دهد. محققین با استفاده TEM که نوعی از میکروسکوپی الکترونی است و به کارگیری روش‌های سیتوشیمیائی و ایمونوسیتوشیمیائی، ساختار کینتوپلاست را شناسائی نموده‌اند. هر چند شناسائی کینتوپلاست قبلاً توسط میکروسکوپ نوری انجام شده بود، ولی تشخیص ساختار دقیق مولکولی Kdna توسط روش TEM، امکان‌پذیر شده است. اهمیت شناسائی این انگل‌ها به علت وجود جنس‌های متنوع و بسیار مهم درون این خانواده می‌باشد که حیوانات، گیاهان و حشرات را آلوده می‌نمایند. کینتوپلاست، شدیداً به داروهای شلاته‌کننده DNA یا مهارکننده‌های سنتز DNA حساس می‌باشد. به همین دلیل یک هدف بسیار مهم برای داروهای ضد تریپانوزوماتیده می‌باشد. با استفاده از TEM و تهیه گسترش‌های بسیار نازک، بررسی فراساختاری و ترکیب سلول انگل فراهم شده است. تا قبل از ۱۹۸۰، آنالیز ساختاری نمونه‌های بیولوژیکی به طور اولیه توسط میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی و TEM انجام می گردید. در سال ۱۹۸۶، روش AFM که یکی از میکروسکوپ‌های روبشی (SPM) می‌باشد، ابداع گردید. این روش دارای حداقل فرایند آماده‌سازی نمونه پیش از میکروسکوپی می‌باشد. کاربرد این روش در دانش بیولوژی، اساساً بر قابل روئیت ساختن و شناسائی مولکول‌های زیستی استوار است. در این روش، kDNA محلول که حاوی یون‌های منیزیوم می‌باشد، بر روی سطح بستر مخصوصی به نام میکا قرار داده می‌شود و پس از شستشو با آب مقطر دیونیزه و اتانل، خشک می‌شود. وجود یون‌های منیزیوم، بازشدن شبکه kDNA را تسهیل می‌نماید و چسبندگی آن را به سطح افزایش می‌دهد. با این روش میکروسکوپی، تصاویر با وضوح بالا از kDNA و طرز قرار گرفتن شبکه آن آشکار شد. مولکول‌های خوشه‌ای DNA، تشکیل روزت را می‌دهند که اطراف محیط کینتوپلاست و با فاصله منظم 0.2-0.3nm جمع شده‌اند. بنابراین AFM وسیله‌ای است که توسط آن می‌توان دانش فعلی را در جهت

www.SID.ir

Archive of SID

شناخت ساختار و سیستم‌های بیولوژیک که قبلاً قابل مشاهده نبود، گسترش داد(۱۶).

کاربرد میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در مشاهده انگل لیشمانیا درون دستگاه گوارش پشه خاکی

از این روش میکروسکوپی، جهت بررسی مرفولوژی انگل لیشمانیا ماژور *Leishmania major* و بر هم‌کنش آن‌ها با بخش‌های مختلف دستگاه گوارش پشه‌خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی *Phlebotomus papatasi* استفاده شده است. بدین ترتیب، مرفولوژی مراحل مختلف انگل را در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش پشه‌خاکی تشخیص داده‌اند. تعداد زیادی نکتوموناد (nectomonad) طویل در بخش روده میانی در شکم، هاپتوموناد‌ها (haptomonad) متصل شده به کوتیکول دریچه استومادال (stomodeal)، اشکال کوچک کروی متصل به دیواره مری و توده‌هایی از پروماستیگوت‌های کوتاه که در اصل اشکال عفونی انگل می‌باشند، آزادانه در بخش قدامی روده میانی واقع در قفسه سینه و مری قرار گرفته‌اند(۲۷).

مطالعه تاثیر داروی ضد کرم پرازیکوانتیل (Praziquantel) بر روی سستود هیمنولپیس نانا (Hymenolepis nana) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

پس از مواجهه انگل هیمنولپیس نانا با مقادیر مختلف داروی ضد کرمی پرازیکوانتل، به شکل برون تنی (in vitro)، نتایج با کمک روش‌های الکترونی روبشی و عبوری مورد مطالعه قرار گرفت. تشکیل واکوئل در دیواره انگل، به طور واضح در ناحیه گردن کرم پس از پنج دقیقه مواجهه کرم با یک میگروگرم در سی سی از دارو مشاهده گردید. تشکیل واکوئل در نهایت منجر به تخریب لایه سین سیشیال (syncytial) در رأس تگومنت انگل گردید، در حالی‌که میکروتریش‌های (microtriches) تگومنت و پوشش سطحی (surface coat) سالم باقی مانده بودند. با روش میکروسکوپی الکترونی عبوری، لایه‌های بسیار نازک از نمونه با اولترا میکروتوم فراهم می گردد و بدین صورت، مشاهده تغییرات ایجاد شده درون و بیرون انگل به راحتی و با وضوح بسیار، امکان پذیر می گردد(۲۸).

مطالعه تاثیر داروهای ضد انگلی آلبندازول (Albendazole) و مترونیدازول (Metronidazole) بر روی تک یاخته های ژیاردیا دئودنالیه (Giardia duodenalis)، تریکوموناس واژینالیس (Trichomonas vaginalis) و اسپیرونوکلئوس موریس (Spironucleus muris) توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

این سه انگل نزدیک به‌هم، تحت تاثیر داروهای آلبندازول و مترونیدازول قرار گرفته و توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، تغییرات ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی‌های فراساختاری، حساسیت‌های متفاوت این تک یاخته‌ها را به داروهای مذکور نشان دادند، به طوری که اجزای اسکلت سلولی موجود در دیسک مکنده ژیاردیا نسبت به آلبندازول حساس می‌باشد، در حالی که دو انگل دیگر که فاقد دیسک مکنده می‌باشند، تحت تاثیر آلبندازول قرار نمی‌گیرند. این نظریه مطرح می‌شود که آلبندازول به پروتیین های اسکلت سلولی متصل می‌شود و باعث جدا شدن انگل از بستر روده و جدایی از منبع تغذیه می‌شود و انگل نهایتاً از بین می‌رود. در حالی که مترونیدازول تاثیر متفاوتی داشته و در بررسی‌های فراساختاری، مشخص شده که این دارو با تخریب لایه‌های درونی سلول، باعث تخریب این انگل‌ها می گردند(۲۹).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تنوع روش‌های تشخیص آزمایشگاهی، انتخاب یک روش مرجع را دشوار می‌سازد، با این حال پیشرفت روش‌های نوین اجتناب ناپذیر می‌باشد. استفاده از روش‌های مذکور، باعث سهولت در بررسی خصوصیات فراساختاری عوامل ایجادکننده عفونت‌های انگلی و هم‌چنین صرفه‌جوئی در زمان می باشد. بعضی از این روش‌ها مانند AFM با

www.SID.ir

Archive of SID

وجود کارآیی بالا، نیاز به تجهیزات خاصی دارد کـه در همه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی موجود نیست، لذا استفاده از این روش‌ها، محدود خواهد بود و بایـد از روش‌هـای در دسترس‌تر استفاده نمـود. از آن‌جـا کـه روش AFM، هنوز در حال پیشرفت می‌باشد، چشم‌انداز آینده، طراحـی پروب‌های فـوق‌العـاده نـوک تیـز و حسـاس بـا وضـوح بـالاتر بـه منظـور شناسـایی سـاختمان‌هـای فراسـاختاری انگل‌ها خواهد بود. فراهم شدن آنالیز سـلول هـای زنـده نشـاندار شـده بـا نشـانگرهای فلوئورسـانت و اسـتفاده از روش میکروسکوپی مرتبط با AFM، می‌تواند اطلاعـات با جزئیات از ساختارهای مخصوص را در اختیار محققان قرار دهد. در مجموع روش‌های نوین نانوسـکوپی ماننـد AFM، به دلایل گونـاگون و کـارآیی‌هـای متنـوع و در اختیار گذاشتن اطلاعات دقیق‌تر و متنوع تـر، بـه‌تـدریج بـه‌عنـوان روش مکمـل مناسـبی بـرای نسـل‌هـای قبلـی میکروسکوپ الکترونی ماننـد میکروسـکوپ الکترونـی روبشی (SEM) و عبوری (TEM) تبـدیل خواهنـد شـد.

هم‌چنین با استفاده از اندازه‌گیری‌هـای اسپکتروسـکوپی متنوع، اطلاعات بیش تری از خصوصیات سطحی ماننـد شارژ، خواص ارتجاعی و برهم کـنش لیگانـد- رسـپتور در اختیار محققین قرار خواهد داد.

در پایان پیشنهاد می‌شود بـا توجـه بـه فـراهم بـودن استفاده از تکنیک نانوسکوپی AFM، در آزمایشگاه‌های جامع کشور ایـران از جملـه آزمایشـگاه جـامع دانشـگاه علوم پزشکی مازندران، استفاده از این تکنولـوژی نـوین در زمینه عفونت‌های انگلی به ویژه تک یاخته‌های مهـم بیماری‌زا مانند گونه‌های مختلف لیشمانیا، پلاسمودیوم‌ها و تری پانوزوما، بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد و در نهایت موجب پیشرفت‌های بیش‌تر در این زمینه گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از خانم آزاده میزانی به خاطر همکاری در تهیه برخی تصاویر، کمال تشکر و قدردانی بـه عمـل می‌آید.

References

1. Kalinin SV, GrovermanA.Scanning probe microscopy, electrical and electromechanical phenomena at the nano scale. New York: Springer; 2007.
2. Peng Xi, Hao Xie, Yujia Liu, Yichen Ding . Optical Nanoscopy and Novel Microscopy Techniques. Florida: CRC Press; 2015.
3. Rupali Sh, SayantanM, Lakshmayya Laxmi G. Nanotechnology: The coming revolution in modern biology and medicine. International Research Journal of Pharmacy 2012; 3(5): 109-118.
4. DufreneYF, Pelling AE. Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion. Nanoscale 2013; 5(10): 4094-4014.
5. Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan SC, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. Indian J Med Rese 2009; 130(6): 689-701.
6. Lee WG, Kim YG, Chung BG, Khademhossein A. Nano/Microfluidics for diagnosis of infectious diseases in developing countries. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62(4-5): 449-457.
7. Galluzzo CW, Eperon G, Mauris A, Chappuis F. Old World cutaneous leishmaniasis. Rev Med Suisse 2013; 9(385): 990-995.
8. Blonski KM, Blödorn-Schlicht N, Falk TM, Faye RS, Clausen OP. Increased detection of cutaneous leishmaniasis in Norway by use of polymerase chain reaction. APIMIS 2012; 120(7): 591-596.
9. Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. J Dermatol Case Rep 2013; 7(2): 31-41

www.SID.ir

Archive of SID

10. Weigle KA, de Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg 1987; 36(3): 489-496.
11. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Commitee on the Control of Leishmaniases, Geneva,WHO; 2010.
12. Pagheh AS, Fakhar M, MesgarianF, Gholami Sh, Badiee F. Detection and Identification of Causative Agent of Cutaneous Leishmaniasis Using Specific PCR. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 22(1): 85-92.
13. Aikawa M, Kamanura K, Shiraishi S, Matsumoto Y, Arwati H, Torii M, et al. Membrane knobs of unfixed Plasmodium falciparum infected erythrocytes: new findings as revealed by atomic force microscopy and surface potential spectroscopy. Exp Parasitol 1996; 84(3): 339-343.
14. de Souza W, Rocha GM. Atomic force microscopy: a tool to analyze the structural organization of pathogenic protozoa. Trends Parasitol 2011; 27(4): 160-167.
15. Diaspro A. Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy. London: Chapman and Hall; 2010.
16. Agrawal U, Daniel T Reilly D.T, Schroeder CH.M. Zooming in on biological processes with fluorescence nanoscopy. Curr Opin Biotech 2013; 24(4): 646-653.
17. Kohl T, Westphal V, Hell SW, Lehnart SE. Super resolution microscopy in heart, Cardiac nanoscopy. J Mol Cell Cardiol 2013; (58): 13-21.
18. Requejo-Isidro J. Fluorescence nanoscopy. Methods and applications. J Chem Biol 2013; 6(3): 97–120.
19. Rocha GM, Miranda K, Weissmüller G, Bisch PM, de Souza W. Visualization of the flagellar surface of protists by atomic force microscopy. Micron 2010; 41(8): 939-944.
20. Eaton P, Bittencourt CR, Costa Silva V, Véras LM, Costa CH, Feio MJ, et al. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in Leishmania infantum (syn. Leishmania chagasi) cells. Nanomedicine 2014; 10(2): 483-490.
21. Chen CJ. Introduction to Scanning Tunneling Microscopy. 2thed. New York: Oxford University Press. 2008.
22. de Yarbuh L, Colasante C, Alarcón M, Moreno E. Atomic Force Microscopy of host cell-amastigote interaction in cutaneous leishmaniasis. Kasmera 2004; 32(2): 127-136.
23. KapoorP, Ashutosh A, Naik R,Ganguli M, Siddiqi MI, Sahasrabuddhe AA, et al. Leishmania actin binds and nicks kDNA as well as inhibits decatenation activity of type II topoisomerase. Nucleic Acids Res 2010; 38(10): 3308-3317.
24. Mondal S, Roy P, Das S, Halder A, Mukherjee A, Bera T. In Vitro Susceptibilities of Wild and Drug Resistant Leishmania donovani Amastigote Stages to Andrographolide Nanoparticle: Role of Vitamin E Derivative TPGS for Nanoparticle Efficacy. Plos One 2013; 8(12): e81492.
25. Akaki M, Nakano Y, Nagayasu E, Nagakura K, Kawai S, Aikawa M. Invasive forms of Toxoplasma gondii, Leishmania amazonensis and Trypanosoma cruzi have positive charge at their contact site with host cells. Parasitol Res 2001: 87(3): 193-197.
26. Roy P, Das S, Bera T, Mondol S, Mukherjee A. Andrographolide nanoparticles in leishmaniasis: characterization and in vitro evaluations. Int J Nanomedicine 2010; 5: 1113-1121.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Cavalcanti1 DP, de Souza W.Contribution of electron microscopy and atomic force microscopy to investigate The unique organization of mitochondrial DNA from trypanosomatid protozoa. Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology 2012; 2(5): 660-667.
28. Bhardwaj R, Saudagar P, Kumar Dubey V. Nanobiosciences: A Contemporary Approach in Antiparasitic Drugs. M C Pharmacol 2012; 4(3): 97-103.
29. de Almeida MP, CarabineiroS AC. The role of nanogold in human tropical diseases: research, detection and therapy. Gold Bull 2013; 46(2): 65-79.
30. Rahi AA, Charrakh AA. Biosynthesis of silver nanoparticles by Leishmania tropica. Afr J Biotechnol 2013; 12(48): 6718-6722.
31. Last JA, Huber TA, Sasaki DY. Atomic Force Microscopy Studies of Lipophosphoglycan (LPG) Molecules in Lipid Bilayers 2003. Available at https://searchworks.stanford. edu/view/11192501
32. Englund PT, Dimaio DC, Prices SS. A Nicked Form of Kinetoplast DNA in Leishmania tarentolae. J Bio Chem 1977; 25(17): 6208-6216.
33. Warburg A, Hamada GS, Schlein Y, Shire D. Scanning electron microscopy of *Leishmania* major in Phlebotomus papatasi. Z Parasitenkd 1986; 72(4): 423-431.
34. Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H. Scanning and transmission electron microscope studies on the efficacy of praziquantel on Hymenolepis nana (Cestoda) in vitro. J Parasitol Res 1980; 61(2): 121-133.
35. Oxberry ME, Thompson RC, Reynoldson JA. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of Giardia duodenalis, trichomonas vaginalis and Spironucleus muris using transmission electron microscopy. Int J Parasitol 1994; 24(5): 695-703.

www.SID.ir