

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

Bavand Z¹, Gholami Sh^{2*}, Honary S³, Rahimi-Esboei B⁴, Torabi N⁴, Barabadi H¹

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 investigate 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
Email: sgholami200@gmail.com

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

زهرا باوند¹، شیرزاد غلامی^{2*}، سهیلا هنری³، بهمن رحیمی اسبویی⁴، نگین ترابی⁴، حامد برآبادی¹

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 ژیا ردیازیس 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 ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر کیست‌های ژیا ردیا 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 میلی گرم/میلی لیتر 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 میلی گرم/میلی لیتر 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 میلی گرم/میلی لیتر تا 96 درصد در غلظت 0/3 میلی گرم/میلی لیتر می‌باشد ($p < 0/5$). در نتیجه با توجه به غلظت‌های نانو ذرات طلا استفاده شده در مقایسه با مترونیدازول، تاثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی گرم/میلی لیتر تقریباً مشابه میزان تاثیر داروی مترونیدازول در درمان ژیا ردیا است.

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

واژگان کلیدی: ژیا ردیا 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

مقدمه

ژیا ردیا لامبلیا (*Giardia lamblia*) تک یاخته تازک دار روده کوچک انسان می باشد که از تمام نقاط دنیا گزارش شده است. میزان آلودگی آن در مناطق مختلف جهان از 1 تا 25 درصد متفاوت است (1، 2). ژیا ردیا لامبلیا از شایع ترین انگل های روده ای در کشور ما ایران به خصوص نواحی شمال است (3، 4). تخمین زده می شود سالانه 280 میلیون عفونت انسانی در سراسر جهان ایجاد می شود. ژیا ردیا لامبلیا، عامل ژیا ردیازیس، می باشد که در مناطق با آب و هوای معتدل و گرم سیری یافت می شود و می تواند باعث بیماری اسهال (استثا نوره) به خصوص در کودکان و سوء جذب روده ای و از دست دادن وزن شود (2، 3). با توجه به انتظار مقاومت انگل به دارو در کشور ما، پیش گیری و درمان این بیماری به ویژه در کودکان بسیار ضروری است (5، 6).

با توجه به تنوع ژنتیکی انگل تعیین ایزوله، کشت و تست های تعیین حساسیت ژیا ردیا 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 می گیرد که این داروها اثرات جانبی متعددی دارند و تأثیر آن ها قطعی نیست (7، 8). اثرات سرطانزایی و جهش زایی برخی از آن ها نیز در مدل های حیوانی گزارش شده است (8). هم چنین داروهای فوق دارای خاصیت سرطانزایی در زنان و بچه ها می باشند و در دوران بارداری نیز منع مصرف دارند (9). از طرفی گزارش هایی 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 ژیا ردیازیس به وسیله کیست منتقل و شیوع پیدا می کند و فرم تروفوزوئیت آن در بیماران اهمیت دارد. لذا برای از بین بردن کیست و تروفوزوئیت روش های مختلفی پیشنهاد می شود که یکی از راه های پیشنهادی توسط سازمان جهانی بهداشت، کاربرد گیاهان و مواد خوراکی

طبیعی در از بین بردن کیست انگل می باشد (14). علاوه بر داروهای مصرفی مترونیدازول، فورازولیدون، تینیدازول و کیناکرین در سال های اخیر استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان به واسطه اثرات جانبی کم یا هیچ آن ها رو به افزایش می باشد (11).

نانو ذرات طلا به عنوان ضد HIV، آنتی آنتی بیوتیک (anti angiogenesis)، ضد مالاریا و ضد درد مفاصل عامل استفاده می شود. علاوه بر این با توجه به این که از نانو ذرات در زمینه های مختلف به خصوص در علوم زیستی و پزشکی استفاده می شود خواص الکترونیکی نانو ذرات طلا را می توان نه تنها با تغییر اندازه آن ها بلکه ماهیت عامل پوشش و فاصله بین نانو ذرت تنظیم کرد که این وابسته به روش سنتزی به کار رفته می باشد. روش های مختلفی برای سنتز نانو ذرات طلا وجود دارد که به دسته شیمیایی فیزیکی و بیولوژی تقسیم بندی می شوند (13، 15). کاهش شیمیایی روش کاربردی برای تهیه نانو ذرات فلزی، به روش بیولوژیکی یا سنتز نانو ذرات ترجیح داده می شود. 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 می کنند (21-16). این فلز به عنوان داروی غیر الی در درمان برخی بیماری ها مثل آرتروز 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، پنتادایمین، 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 انگل های 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 بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی (vitro In) انجام شد. نتایج این مطالعه می تواند جهت یافتن ترکیبی جایگزین در درمان انگل ژیا ردیا مورد استفاده قرار گیرد که فاقد معایب داروهای

دمای 28 درجه سانتی گراد 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 بر روی کیستی: در این مطالعه غلظت‌های 0/05، 0/1 و 0/3 میلی گرم/میلی لیتر از نانو ذرات طلا تهیه شد سپس مقدار 2 میلی لیتر از هر غلظت در لوله آزمایش جداگانه آماده و به هر لوله آزمایش 10000 کیستی زیاردیا لامبلیا اضافه شد و در نهایت تاثیر غلظت‌های مختلف از گیاه بر حیات کیستی (میزان زنده بودن) در زمان‌های 5، 15، 30، 60 و 180 دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت (4). برای تعیین درصد حیات کیستی‌ها از روش رنگ آمیزی حیاتی کیستی‌ها با اتوزین 0/1 درصد استفاده شد و هر آزمایش برای تأیید سه بار در شرایط 37 درجه سانتی گراد تکرار شد. اطلاعات حاصل از مطالعه در مقایسه با گروه کنترل مثبت که حاوی کیستی و مترونیدازول با غلظت 5 میلی گرم/میلی لیتر، بود ثبت گردید. در این مطالعه میانگین، درصد بقای کیستی‌ها و میانگین سرعت نابودی کیستی‌ها 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 و student-t) و کای دو (Chi-square) با استفاده از نرم افزار SSPS تجزیه تحلیل آماری شد.

یافته‌ها

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

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

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر کیستی‌های زیاردیا 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 کیستی زیاردیا 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 مجدداً با 10 برابر حجم آب مخلوط و با همان سرعت و زمان سانتریفوژ و به رسوب حاصل 5 میلی لیتر آب اضافه شد. محلول فوق به 3 میلی لیتر 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، کیستی‌ها را از بین لایه‌های اول و دوم با پیت پاستور جمع آوری و پس از دو بار شستشو با آب مقطر برای انجام آزمایش آماده شدند. برای شمارش کیستی‌ها از لام نئوبار استفاده شد. در ضمن نمونه‌ها را می‌توان در دمای 4 درجه سانتی گراد برای انجام آزمایشات مرحله بعد نگهداری کرد (3، 22).

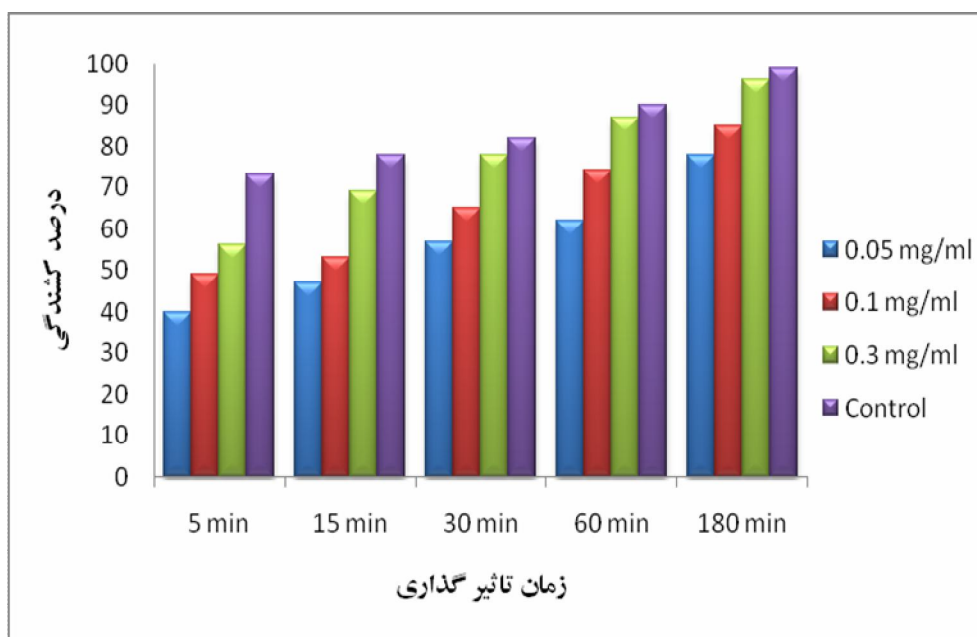
در مطالعه حاضر از نانو ذرات طلا در سه غلظت 0/05، 0/1 و 0/3 میلی گرم/میلی لیتر استفاده گردید. تهیه نانو طلا در گروه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی ساری با روش استاندارد انجام شد. قارچ پنسیلیوم سیترونوم در محیط کشت مایع czapek dox broth کشت شد و پس از انکوباسیون در شیکر انکوباتور در دمای 28 درجه سانتی گراد با دور 200 rpm به مدت 10 روز، قارچ‌های رشد کرده از محیط کشت جدا گردید. سپس به 100 میلی لیتر از محیط کشت مایع (سوپرناتانت)، 100 میلی لیتر محلول 1 میلی مولار کلرید طلا اضافه کرده و دوباره در

85 درصد در 180 دقیقه و در غلظت 0/3 میلی گرم/میلی لیتر از 62 درصد در 5 دقیقه به 96 درصد در 180 دقیقه افزایش یافت که بیانگر تاثیر کشندگی نانو ذرات طلا با افزایش غلظت و زمان مجاورت بر روی کیست‌های ژیاوردیا لامبلیا می‌باشد که این تفاوت در میزان تاثیر از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد ($p < 0/5$) (جدول 1، نمودار 1)

1- با تاثیر غلظت 0/05 میلی گرم/میلی لیتر بر روی کیست‌های ژیاوردیا 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 میلی گرم/میلی لیتر با افزایش زمان مجاورت درصد کشندگی نانو ذرات طلا از 49 درصد در 5 دقیقه به

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

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



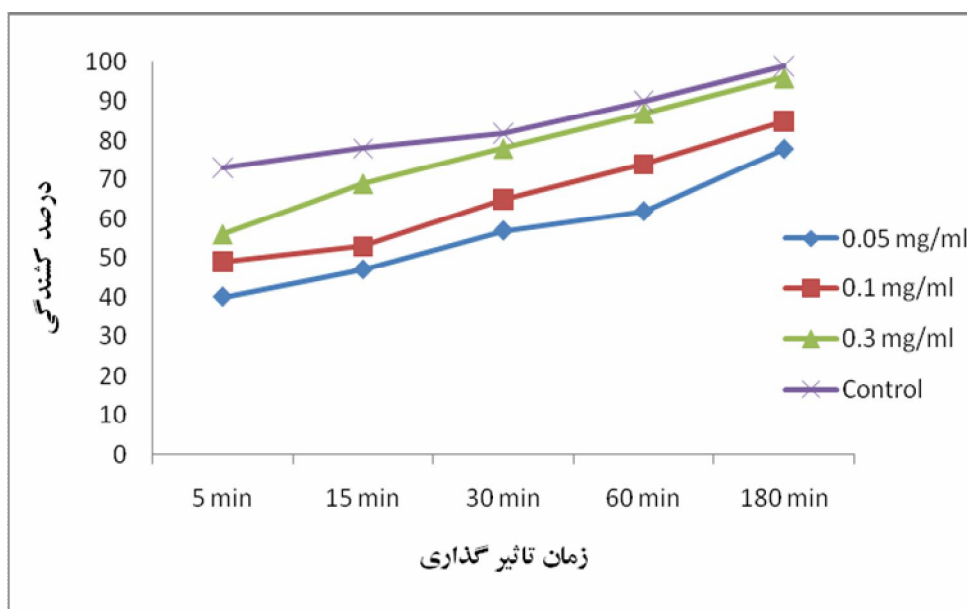
نمودار 1. میانگین درصد تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات طلا بر روی کیست‌های ژیاوردیا لامبلیا در زمان‌های مختلف

لامبلیا با نانو ذرات طلا با میانگین درصد کشندگی از 40 درصد در غلظت 0/05 میلی گرم/میلی لیتر، 49 درصد در غلظت 0/1 میلی گرم/میلی لیتر و 56 درصد در غلظت 0/3 میلی گرم/میلی لیتر در مقایسه با میانگین درصد کشندگی در

2. بررسی تاثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت‌های 0/05، 0/1 و 0/3 میلی گرم/میلی لیتر بر حسب زمان در مقایسه با داروی مترونیدازول (کنترل مثبت) نشان می‌دهد که با افزایش زمان مجاورت کیست‌های ژیاوردیا

180 دقیقه) دارای میزان کشندگی حدود 80 درصد و در غلظت 0/3 میلی مولار در 180 دقیقه 96 درصد می باشد هر چند در مقایسه میزان کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 1/5 میلی مولار در 180 دقیقه با مترونیدازول این اختلاف معنی دار نمی باشد ($p < 0/5$) (جدول 1، نمودار 2).

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 میلی گرم/میلی مشاهده شد که این اختلاف با افزایش غلظت و زمان از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($p < 0/5$). در نتیجه نانو ذرات طلا در حداقل غلظت موثر (0/05 میلی گرم/میلی) با افزایش زمان مجاورت (در



نمودار 2. میانگین درصد تاثیر غلظت های مختلف نانو ذرات طلا بر روی کیست های ژیا ردیا لامبلیا در زمان های مختلف

نمی باشد ($p < 0/5$). اما در مقایسه دو غلظت دیگر این اختلاف تا حدودی معنی دار می باشد (جدول 1). در نتیجه با توجه به غلظت های نانو ذرات طلا استفاده شده در این مطالعه در مقایسه با مترونیدازول که غلظت دارویی آن 5 میلی گرم /میلی لیتر است تاثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی گرم /میلی لیتر نزدیک به میزان تاثیر دارویی مترونیدازول به عنوان داروی انتخابی در درمان ژیا ردیا لامبلیا است. ضمناً نتایج این تحقیق نشان می دهد داروی مترونیدازول در غلظت ثابت با افزایش زمان مجاورت 60 و 180 دقیقه با کیست های ژیا ردیا در مقایسه با زمان های 5، 15 و 30 دقیقه میزان تاثیر کشندگی بیشتری از خود نشان داده است (نمودار 1 و 2).

3. با مقایسه اثر کشندگی نانو ذرات طلا بر روی کیست های ژیا ردیا لامبلیا در سه غلظت متفاوت نتایج بررسی نشان می دهد که بیشترین اثر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی گرم/میلی لیتر در 180 دقیقه (3 ساعت) 96 درصد بوده است که در مقایسه با گروه با غلظت 0/1 میلی گرم/میلی 85 درصد در 180 دقیقه میزان تاثیر نانو ذره طلا افزایش یافته است این اختلاف با توجه به 3 برابر شدن غلظت معنی دار نمی باشد ($p < 0/5$). مقایسه نتایج تاثیر نانو ذره طلا بر روی کیست های ژیا ردیا در سه غلظت مورد استفاده در زمان های متفاوت با کنترل مثبت (مترونیدازول) نشان می دهد که میانگین اثر کشندگی مترونیدازول در 180 دقیقه 99 درصد بوده است. این اختلاف بین غلظت 0/3 میلی گرم/میلی و مترونیدازول (کنترل مثبت) معنی دار

بحث

توجه به این که 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 آرتريت روماتوئید و اخیراً 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، پنتامین، 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 ژیا ردیا می‌تواند در شناخت روش‌های درمانی موثر در بیماری ژیا ردیازیس 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 و 40 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. ضمناً در این مطالعه درصد کشندگی انگل گزارش نشد هرچند تعداد اماستیگوت انگل در زخم به طور معنی داری کاهش یافت (7).

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

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 ژیا ردیا 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 ژیا ردیا 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 ژیا ردیا 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 ژیا ردیا 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 ژیا ردیا 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 تاثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت کمتر یعنی 0/3 میلی‌گرم/میلی‌لیتر نزدیک به میزان تاثیر داروی مترونیدازول به عنوان داروی انتخابی در درمان ژیا ردیا لامبلیا 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 قرار گیرد. با

ژیا ردیا (یا درصد کشندگی) به نحو معنی داری به ویژه در غلظت های 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر افزایش می یابد. در این تحقیق با توجه به اثر کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا، گندنا را گیاهی موثر در از بین بردن کیست های ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی معرفی نمودند (3، 29).

در مطالعه حاضر بررسی تاثیر کشندگی نانو ذرات طلا در غلظت های 0/05، 0/1 و 0/3 میلی گرم/میلی لیتر بر حسب زمان در مقایسه با داروی مترونیدازول (کنترل مثبت) نشان می دهد که با افزایش زمان مجاورت کیست های ژیا ردیا 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 می یابد. در نتیجه نانو ذرات طلا در غلظت موثر (0/3 میلی گرم/میلی لیتر) با افزایش زمان مجاورت (در 180 دقیقه) دارای میزان کشندگی بالایی در مقایسه با دو غلظت دیگر از خود نشان می دهد. در سال های اخیر مطالعات مختلف در زمینه بررسی خواص ضدانگلی نانو ذرات فلزی مانند نقره و موادی مانند کیتوزان بر روی ژیا ردیا 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 و کرکیومن تحقیقاتی را روی کیست ژیا ردیا انجام دادند. در این بررسی ذرات نانو نقره در کنار ذرات نانو کیتوزان اثر کشندگی بیشتری روی کیست ژیا ردیا نسبت به نانو نقره و کرکیومن و هم چنین کیتوزان و کرکیومن داشت اما نه به طور 100 درصد. رات هایی 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 ژیا ردیا مانند موسیر آویشن باریک، در غلظت 0/015 میلی گرم بر میلی لیتر، اته در غلظت 2/2 میلی گرم بر میلی لیتر معرفی شده اند (28). هر چند تاثیر گیاهان دارویی مانند سیر و موسیر و آویشن یا داروهای گیاهی دیگر بر روی کیست ژیا ردیا در تحقیقات قبلی گزارش شده است

عفونت ناشی از ژیا ردیا لامبلیا به ویژه در مبتلایان به گاستروانتریت در گروه های سنی مختلف با روش های 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 برخوردار است. مطالعه تاثیر خواص نانو ذرات و گیاهان بومی هر منطقه بر روی مرحله کیستی و تروفوزوئیت در تحقیقات سال های 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 کیست های ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی پس از 60 دقیقه تماس عصاره یا اسانس با کیست ژیا ردیا لامبلیا حداقل غلظت عصاره هیدروالکلی و اسانس زنبان 100 میلی گرم بر میلی لیتر پس 120 دقیقه 75 میلی گرم بر میلی لیتر پس از 180 دقیقه 75 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. در این مطالعه اثر کشندگی هیدروالکلی و اسانس زنبان در محیط آزمایشگاه بر روی کیست های ژیا ردیا گزارش شد. در این مطالعه نتایج 180 دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره الکلی باعث از بین رفتن 100 درصد کیست های ژیا ردیا شده است که با نتایج تحقیق حاضر در غلظت 1/5 میلی مولار تا حدودی مطابقت دارد (24). هم چنین در مطالعه رحیمی و همکاران و غلامی و همکاران تاثیر غلظت های متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا و آلزی که گیاهان بومی استان مازندران است با توجه به خصوصیات و ترکیبات آن دو گیاه، بر روی کیست های ژیا ردیا در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از تاثیر غلظت های متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا و آلزی بر روی کیست ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی با افزایش غلظت گیاه در زمان معین میانگین درصد کشندگی بر روی کیست ها افزایش می یابد. از طرفی در این تحقیق با افزایش زمان مجاورت عصاره هیدروالکلی گیاه گندنا در هر یک از غلظت ها درصد کشندگی و تاثیر گیاهی در از بین بردن کیست های

- 2- Edrisian G, Rezaeean M, Ghorbani M, Keshavarz M, Mohebbali M. Medical protozoology. Tehran: University of Medical sciences; 2008. p. 175-6. [Persian]
- 3- Rahimi-Esboei B, Gholami S, Azadbakht M. Effect of Hydroalcoholic 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, Mobedi I, et al. Intestinal 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. [persian]
- 7- Torabi N, Mohebbali M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Edrissian GH, Esmaili 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, Snyderman DR. Late incidence of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study. *Clinical infectious diseases.* 1998;26(2):384-8.

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

نتیجه گیری

بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه نانو ذرات طلا در غلظت 0/3 میلی گرم/میلی لیترار به عنوان یک ترکیب موثر جهت از بین بردن کیست های ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی می تواند مورد استفاده قرار گیرد. بنابر این می توان از نانو ذرات فلزی مانند طلا نیز در از بین بردن کیست ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی در غلظت های موثر جهت استفاده درمانی یا در مطالعات تکمیلی بر روی تروفوزوئیت ژیا ردیا لامبلیا یا سایر تک یاخته های روده ای در حیوانات آزمایشگاهی استفاده کرد. هم چنین نتایج مطالعه حاضر می تواند جهت یافتن ترکیبی جایگزین در درمان انگل ژیا ردیا مورد استفاده قرار گیرد 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 فارچ 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 می آید. 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 ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی" امکان انجام مطالعه را با حمایت و مساعدت مالی فراهم آوردند تشکر به عمل می آید.

منابع

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

- 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. Giardicidal 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.
- 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.

- 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 Hydroalcoholic 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.
- 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*