Qom University of Medical Sciences Journal

August 2022. Volume 16. Number 5

Research Paper

In-vitro Study on the Anti-leishmania Effects of Silver Nanoparticles on Leishmanaia Major Promastigotes

Roghayeh Norouzi[1], Abolghasem Siadatpanah[2], Ruhollah Fateh[3,4], Fariba Sohrabi[3], *Seyed Jafar Adnani Sadati [3,4]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Department of Nursing, Ferdows School of Paramedical and Health, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.
3. Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
4. Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Cellular and Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Norouzi R, Siadatpanah A, Fateh R, Sohrabi F, Adnani Sadati, SJ. [In-vitro Study on the Anti-Leishmania Effects of Silver Nanoparticles on Leishmanaia Major Promastigotes (Persian)]. Qom University of Medical Sciences Journal. 2022; 16(5):414-429. https://doi.org/10.32598/qums.16.5.377.1

doi https://doi.org/10.32598/qums.16.5.377.1

CC BY NC

Received: 24 Apr 2022

Accepted: 19 Jul 2022

Available Online: 01 Aug 2022

Keywords:
Silver, Nanoparticles, antileishmania activity, Leishmania major, In vitro techniques

ABSTRACT

Background and Objectives Cutaneous leishmaniasis is one of the most important health-threatening diseases in Iran and other countries. Glucantime is currently used to treat this disease, but due to its side effects and high resistance, alternative therapies such as the use of nanoparticles have been considered by researchers. This study aims to investigate the anti-leishmania activity of silver nanoparticles on Leishmania major in vitro.

Methods This is an experimental study on the anti-leishmania activities of silver nanoparticles at different concentrations of 0.75-0.96 µg/ml after 24, 48 and 72 hours of exposure to 106 live Leishmania major promastigotes. The numbers of live parasites were counted by Trypan Blue on a neobar slide using optical microscope (Hemocytometer method). Glucantime and distilled water were considered as positive and negative controls, respectively. The half-maximal inhibitory concentration (IC50) was calculated by SigmaPlot™ software, version 13. All reactions were done three times and their average was considered as final result.

Results All concentrations of silver nanoparticles had anti-leishmania activity, where the concentration of 96 µg/ml had the highest effect (100%) 72 hours after exposure. The IC50 was obtained 36.67, 27.2 and 21.08 µg/ml after 24, 48 and 72 hours of exposure, respectively.

Conclusion Silver nanoparticles have an inhibitory effect on the growth of Leishmania major in different concentrations. However, further in-vivo studies are needed to determine the effictivness of silver nanoparticles.

Corresponding Author:
Seyed Jafar Adnani Sadati, PhD.
Address: Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
Tel: +98 (913) 2819189
E-Mail: jafaradnani@yahoo.com

Qom University of Medical Sciences Journal

Extended Abstract

Introduction

Leishmania strains cause a range of human diseases in tropical and subtropical regions around the world [1], which are manifested in the form of cutaneous, muco-cutaneous, or visceral leishmaniasis or kala-azar [2]. This disease is caused by a type of obligate intracellular protozoan called Leishmania from the Kinetoplastida order. Approximately 350 million people around the world are at risk of developing this disease, and 2 million new cases are reported annually [4, 5].

Transmission of leishmaniasis to humans occurs by the bite of specific ground mosquitos (sandflies) from the subfamily of Phlebotominae and causes a wide range of disorders, from a self-limited skin disease to widespread skin or visceral disease. This disease occurs in two forms: rural and urban cutaneous leishmaniasis [6]. During infection, flagellated promastigotes are penetrated into the vertebrate skin and are phagocytosed by local macrophages. When the parasites enter the phagolysosomes of the macrophage, they can survive from enzymatic digestion and transform into amastigote forms and multiply. Therefore, one of the main challenges in the treatment of cutaneous leishmaniasis is that the specific location of the parasite in the phagolysosomes of the macrophage prevents drug access through therapy [7].

Antimony-based drugs have been the first options for the treatment of leishmaniasis in the past decades, but these drugs have toxic properties on the liver, heart and kidneys, require frequent injections, cause resistance in the parasite, and are not very effective [8-10]. Therefore, it is necessary to prepare a more effective medicine, with fewer side effects, and faster wound healing. In recent years, researchers have become interested in using nanoparticles to treat infectious diseases. Currently, nano-biotechnology is considered as a new way to fight parasites and diseases caused by them [11]. Silver nanoparticles are used in various pharmaceutical and medical fields, textile industries, sanitary ceramics, water refinement, paint, agriculture, animal husbandry, polymer composites for industrial and household applications, and all kinds of water filters [12]. The emergence of drug resistance in different microorganisms of silver nanoparticles caused new hope for the treatment of human infections [13].

The antimicrobial effects of silver are increased with the reduction of their size at nano level. Silver nanoparticles are clusters of silver atoms with a diameter of 1-188 nm, which enter the microorganisms by binding to proteins containing sulfur on the surface of their membrane and, by changing the morphology and permeability of the membrane and affecting the respiratory chain and cell division, causes cell death [14]. Considering the different properties of these nanoparticles, this study aims to investigate the anti-leishmanial activity of silver nanoparticles on Leishmania major parasite in a laboratory culture.

Methods

Leishmania major parasite culture

After obtaining the standard strain of Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) from Pasteur Institute of Iran, it was cultured in a biphasic Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) culture medium. Then, for multiplication, it was transferred in RPMI-1640 culture medium (Sigma, USA) containing antibiotics including penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Gibco Invitrogen, USA), as well as 20% fetal bovine serum. The flasks of the culture medium were transferred to the incubator at a temperature of 25±1°C and were examined daily with an inverted microscope.

Characteristics of silver nanoparticles and preparation of different concentrations

Silver nanoparticles as a black powder was purchased from Pishgaman Nano Materials Company in Iran. The size of nanoparticles was 25-100 nm; its actual density was 10.5 g/cm3 and its purity was 99.99%. Their characteristics were determined by scanning electron microscope (SE EM3200 KYKY Technology Development Ltd, Beijing, China) and transmission electron microscope (TEM, Leo 906, Zeiss 100 KV, Germany). Concentrations of 0.75 to 96 mg/mL were prepared from silver nanoparticles by dissolving them in distilled water. The diluted nanoparticles were sterilized using a 0.22-micron syringe filter with a diameter of 25 mL (Sartorius, Germany).

Effect of silver nanoparticles on promastigotes of Leishmania major and determining the half-maximal inhibitory concentration

To investigate the lethal effect of silver nanoparticles on promastigotes of Leishmania major, 106 parasites in the logarithmic phase were exposed to concentrations of 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48 and 96 µg/mL. Glucanthium (40 ug/mL) and distilled water were used as positive and negative controls, respectively. Three flasks were used for each concentration and for positive and negative controls. All groups were incubated at a temperature of 25±1 °C. After 24, 48 and 72 hours, the number of live parasites was counted by trypan blue on

a neobar slide in an optical microscope (Hemocytometer method). The cytotoxicity of each concentration on parasite promastigotes was calculated by as: GI= (a-b/a), where a shows the number of live parasites in negative control sample and b shows the number of live parasites in the sample containing silver nanoparticles. Then, their half-maximal inhibitory concentration (IC50) was calculated.

Statistical analysis

The data were reported using mean and standard deviation, and SigmaPlot ™ software version 13 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) was used to calculate the IC50.

Results

Results of repeated measures analysis of variance showed that, due to the different effects of silver nanoparticles, there was a significant decrease in the number of Leishmania parasites over time ($P \leq 0.05$). The value of IC50 for silver nanoparticles after 24, 48 and 72 hours was obtained 36.67, 27.2 and 21.08 µg/mL, respectively. The highest cytotoxicity (100%) was observed at a concentration of 96 mg/mL after 72 hours of exposure to the parasite. The numbers of Leishmania promastigotes in different concentrations of silver nanoparticles after 24, 48 and 72 hours of incubation are shown in Table 1, and the effects of different concentrations of silver nanoparticles on Leishmania promastigotes are shown in Table 2. The mean cytotoxicity of silver nanoparticles are shown in Figure 1. Figures 2 and 3 show the scanning and transmission electron microscopy images of silver nanoparticles, respectively.

Discussion

According to the reports of the World Health Organization (WHO), about 14 million people in Africa, Asia, Europe and America are directly affected by leishmaniasis [15]. Antimony-based drugs have been recommended as the main method for treatment of leishmaniasis, but they have some limitations such as high costs, side effects, the need for repeated injections, and incomplete efficacy; therefore, preparing a new anti-leishmaniasis drug is needed. The purpose of this study was to investigate the anti-leishmanial activity of silver nanoparticles on Leishmania major in laboratory conditions. The results revealed that silver nanoparticles in different concentrations had an inhibitory effect on the growth of Leishmania major where the concentration of 96 mg/ml had the greatest anti-leishmanial effect (100%) after 72 hours of exposure. Silver nanoparticles can damage Leishmania parasite by binding to sulfur and phosphorus groups and also by releasing free oxygen radicals [16].

Mayelifar et al. incubated Leishmania major promastigotes with silver nanoparticles for 1 hour and then 8 electric pulses were applied to the samples by an electroporation device. Their results showed that the presence of silver nanoparticles and the simultaneous application of electric pulses provide a significant decrease in parasite survival [17]. Akhzari et al. used liposome and albumin nanoparticles containing activated melittin to treat leishmaniasis wounds caused by Leishmania major. Their results showed that the size of wounds in this group was significantly reduced [18].

Table 1. The number of Leishmania promastigotes in different concentration of silver nanoparticles after 24, 48 and 72 hours

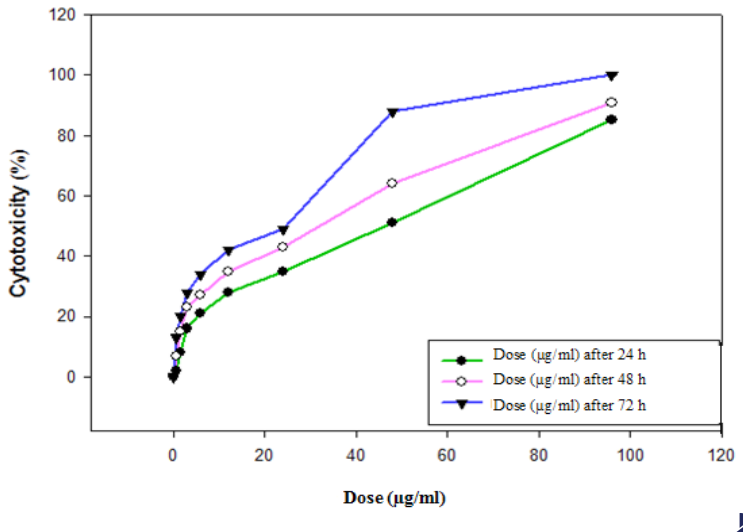
Concentration(µg/ml)	24h	48h	72h	P
0.75	1823	3666	4967	
1.5	1712	3351	4568	
3	1563	3036	4111	
6	1470	2878	3768	<.0004
12	1339	2562	3311	
24	1209	2247	2912	
48	911	1419	685	
96	279	1354	0	
Positive control	0	0	0	
Negative control	1861	3943	5710	

Table 2. The effect of different concentrations of silver nanoparticles on Leishmania major promastigotes after 24, 48 and 72 hours incubation

Concentration(µg/mL)	24h	48h	72h	P
0.75	2	7	13	
1.5	8	15	20	
3	16	23	28	
6	21	27	34	<.000021
12	28	35	42	
24	35	43	49	
48	51	64	88	
96	85	91	100	
Positive control	0	0	0	
Negative control	10	100	100	

Qom University of Medical Sciences Journal

Casa et al. reported that albumin nanoparticles containing amphotericin B. reduced the toxicity of the drug. The histotoxicity of drug against liver, spleen, heart and kidney was also significantly reduced; therefore, they suggested this drug as an alternative to amphotericin B [19]. In another study, Haddad et al. examined the anti-leishmanial effect of curcumin-loaded chitosan nanoparticles on Leishmania major and Leishmania infantum in vitro. By counting the number of parasites, they found that the synthesized nanoparticles had a favorable inhibitory effect on the growth of leishmania major and Leishmania infantum [20]. Torabi et al. showed that gold nanoparticles reduced the number of Leishmania major amastigotes in leishmaniasis wounds and the mortality rate of mice was decreased [21]. The effects of selenium nanoparticles on Leishmania infantum were investigated by Soflaei et al. [22], and the IC50 of nanoparticles against amastigote and Leishmania infantum promastigote was reported as 10 and 25 mg/mL, respectively. This indicates that the anti-leishmanial effect of selenium nanoparticles is greater than that of silver nanoparticles.



Qom University of Medical Sciences Journal

Figure 1. Mean cytotoxicity of different concentrations of silver nanoparticles on Leishmania major promastigotes after 24, 48 and 72 hours

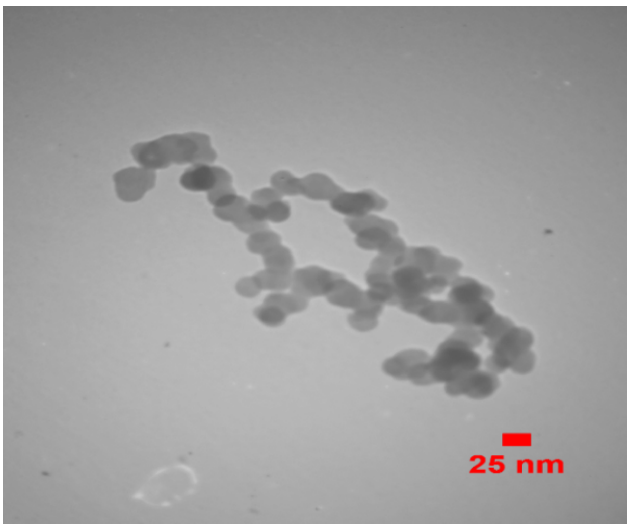


Figure 2. Electron microscopy image of silver nanoparticles (size= 25 nm)

Qom University of Medical Sciences Journal

In a study conducted by Faizabadi et al. on the anti-leishmanial effects of chitosan nanoparticles loaded with excretory-secretory antigens of Leishmania major on the number of apoptotic macrophages, it was shown that chitosan could increase the ability of infected macrophages to eliminate parasite by reducing apoptosis [23]. Another study by Sazgarnia et al. on the effectiveness of heat therapy in the presence of gold nanoparticles and microwave radiation on the survival of promastigotes and amastigotes of Leishmania major showed that the presence of gold nanoparticles during microwave radiation caused more toxicity against promastigotes and amastigotes. Therefore, they suggested heat therapy using microwave rays in the presence of gold nanoparticles as a new treatment approach [24]. Jamei et al. investigated the effect of selenium and silver nanoparticles in healing the wound caused by Leishmania major and found that the diameter of wounds in the group treated with selenium nanoparticles showed no significant difference compared to the control group, while the wound diameter in the group treated with silver nanoparticles showed a significant difference, but it was larger than in the group treated with glucantime (positive control) [25]. The study by Baiocco et al. on inhibitory effect of silver nanoparticle on visceral leishmaniasis showed that silver nanoparticle had a greater effect in killing Leishmania than antimony [26]. In a review study by Elmi et al., it was reported that nanoparticles of silver, gold, chitosan and metal oxides had a inhibiting effect on Leishmania [27]. In the study by Jebali and Kazemi on the effect of silver and gold nanoparticles, titanium dioxide, zinc dioxide, and magnesium dioxide under ultraviolet, infrared and dark conditions showed that silver nanoparticles had the highest anti-leishmanial activity, although both ultraviolet and

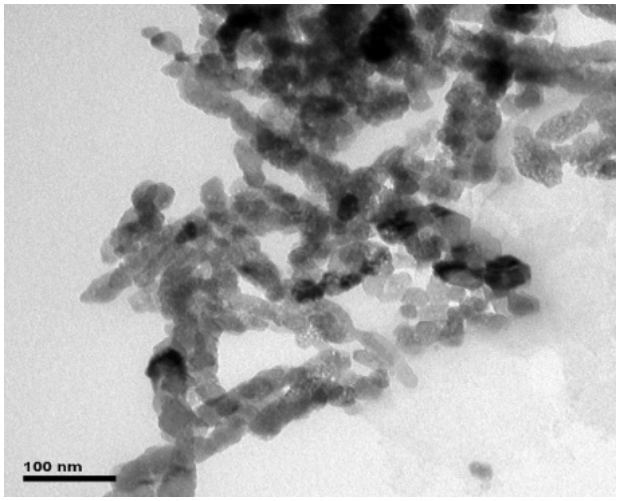


Figure 3. Electron microscopy image of silver nanoparticles (size= 100 nm)

Qom University of Medical Sciences Journal

infrared light had anti-leishmania activity as well [28]. El-Khadragy et al. in a study using silver nanoparticles biosynthesized by Moringa oleifera leaf extract showed their anti-leishmanial activity in a murine model of Leishmania major infection and concluded that treatment with silver nanoparticles biosynthesized using Moringa oleifera extract had a clinically higher and faster effect than standard pentavalent antimonial treatment, probably due to increased antioxidant activity [29]. The discrepancy in the results of different studies can be due to the difference in nanoparticles and the measurement units such as micrograms, milligrams, etc.

Discussion

All concentrations of silver nanoparticles have anti-leishmanial activity, where the concentration of 96 mg/mL has the highest anti-leishmanial effect (100%) 72 hours after exposure to Leishmania major. Further in-vivo studies are needed to determine the efficacy of silver nanoparticles.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the ethics committee of Qom University of Medical Sciences (Code: IR.MUQ.REC.1400.177).

Funding

This study was extracted from a master thesis. This study was funded by Qom University of Medical Sciences.

Authors contributions

The authors contributed equally to this study.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Vice-Chancellor of Research of Qom University of Medical Sciences for financial support.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضدلیشمانیایی نانو ذرات نقره بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت آزمایشگاهی

رقیه نوروزی[۱]، ابوالقاسم سیادت‌پناه[۲]، روح‌الله فاتح[۳،۴]، فریبا سهرابی[۳]، *سید جعفر عدنانی ساداتی[۳،۴]

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. گروه پرستاری، دانشکده پیراپزشکی و بهداشت فردوس، دانشگاه علوم‌پزشکی بیرجند، بیرجند ، ایران.
۳. گروه میکروب‌شناسی، انگل‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی قم، قم، ایران.
۴. گروه میکروب‌شناسی، انگل‌شناسی و ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم‌پزشکی قم، قم، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Norouzi R, Siadatpanah A, Fateh R, Sohrabi F, Adnani Sadati, SJ. [In-vitro Study on the Anti-Leishmania Effects of Silver Nanoparticles on Leishmanaia Major Promastigotes (Persian)]. Qom University of Medical Sciences Journal. 2022; 16(5):414-429. https://doi.org/10.32598/qums.16.5.377.1

doi https://doi.org/10.32598/qums.16.5.377.1

تاریخ دریافت: ۰۴ اردیبهشت ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۲۸ تیر ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف لیشمانیوز جلدی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تهدیدکننده سلامت در ایران و بسیاری از کشورهای جهان است. گلوکانتیم، درحال‌حاضر برای درمان این بیماریا ستفاده می‌شود ولی به دلیل عوارض جانبی و مقاومت بالا، استفاده از روش‌های درمانی جایگزین به‌ویژه استفاده از نانوذرات موردتوجه محققان قرارگرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضدلیشمانیایی نانوذرات نقره بر روی انگل لیشمانیاماژور در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی در این مطالعه تجربی، فعالیت ضدلیشمانیایی نانوذرات نقره در غلظت‌های ۰/۷۵ تا ۰/۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های مواجهه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی ۱۰۶ انگل زنده سویه استاندارد بررسی شد. سپس تعداد انگل‌های زنده توسط تریپان‌بلو با استفاده از لام‌نئوبار و میکروسکوپ نوری (روش هموسیتومتر) شمارش شد. گلوکانتیم و آب‌مقطر به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظرگرفته شدند. حداقل غلظتی از نانوذرات نقره که باعث مهار رشد ۵۰ درصد انگل می‌شود (IC50) توسط نرم‌افزار نسخه ۱۳ سیگما پلات محاسبه شد تمام واکنش‌ها سه‌بار انجام گرفت و نتایج به‌صورت میانگین در نظرگرفته شد.

یافته‌ها نتایج این مطالعه نشان داد تمامی غلظت‌های نانوذرات نقره دارای فعالیت ضدلیشمانیایی هستند. غلظت ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره دارای بیشترین اثر ضدلیشمانیایی ۱۰۰ درصد در زمان مواجهه ۷۲ ساعته است. مقدار IC50 نانوذرات نقره پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی لیشمانیا ماژور ۳۶/۶۷، ۲۷/۲ و ۲۱/۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

نتیجه‌گیری نتایج نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف اثر بازدارندگی بر رشد لیشمانیا ماژور دارد. بااین‌حال، برای تعیین کارایی نانوذرات نقره، تحقیقات بیشتری در شرایط درون‌تنی نیاز است.

کلیدواژه‌ها:
نقره، نانوذرات، فعالیت ضدلیشمانیایی، لیشمانیا ماژور، تکنیک محیط کشت آزمایشگاهی

* **نویسنده مسئول:**
دکتر سید جعفر عدنانی ساداتی
نشانی: قم، دانشگاه علوم‌پزشکی قم، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، انگل‌شناسی و ایمنی‌شناسی.
تلفن: ۲۸۱۹۱۸۹ (۹۱۳) ۹۸+
رایانامه: jafaradnani@yahoo.com

مقدمه

سویه‌های لیشمانیا باعث ایجاد طیفی از بیماری‌های انسانی، در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در سراسر جهان می‌شود [۱]. این بیماری به‌صورت لیشمانیوز جلدی، لیشمانیوز مخاطی پوست و لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار ظاهر می‌شود [۲]. این بیماری توسط نوعی تک‌یاخته درون‌سلولی اجباری به‌نام لیشمانیا از راسته کینتوپلاستیدا به وجود می‌آید. تقریباً ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان در معرض خطر ابتلا به این بیماری هستند و سالانه ۲ میلیون مورد جدید گزارش می‌شود [۳-۵].

انتقال بیماری لیشمانیوز ازطریق نیش گونه خاصی از پشه خاکی زیرخانواده فلوبوتومینه[1] اتفاق می‌افتد و باعث طیف گسترده‌ای از اختلالات، از یک بیماری پوستی خودمحدودشده تا بیماری منتشر جلدی یا احشایی می‌شود. پاتوژنز اساسی بیماری لیشمانیوز جلدی به‌شرح زیر پیشرفت می‌کند. این بیماری به دو صورت لیشمانیوز جلدی روستایی و شهری بروز پیدا می‌کند [۶].

در هنگام عفونت، پروماستیگوت‌های تاژکدار به پوست مهره‌داران نفوذ می‌کنند و توسط ماکروفاژهای موضعی فاگوسیتوز می‌شوند. هنگامی‌که انگل‌ها وارد فاگولیزوزوم‌های ماکروفاژ می‌شوند، انگل‌ها می‌توانند از هضم آنزیمی جان سالم به در ببرند و بنابراین به فرم‌های آماستیگوت تبدیل‌شده و تکثیر می‌شوند. بنابراین یکی از چالش‌های اصلی در درمان لیشمانیوز جلدی این است که مکان خاص انگل در فاگولیزوزوم‌های ماکروفاژ مانع دسترسی دارو ازطریق درمان می‌شود [۷]. از دهه‌های گذشته، جهت درمان این بیماری، ترکیبات آنتی‌موان در اولین خط دفاعی قرارداشته‌اند، ولی این داروها دارای خواص سمی روی کبد، قلب و کلیه‌ها می‌باشند؛ نیاز به تزریق‌های مکرر دارد؛ باعث ایجاد مقاومت در انگل می‌شوند و نیز چندان هم مؤثر نیستند [۸-۱۰]. از این‌رو، تهیه داروی مؤثرتر، با عوارض کمتر و بهبود سریع‌تر زخم، الزامی به‌نظر می‌رسد. بنابراین، در سال‌های اخیر، محققین برای درمان بیماری‌های عفونی به استفاده از نانوذرات روی آوردند. درحال‌حاضر، نانو بیوتکنولوژی به‌عنوان روشی نوین برای مبارزه با انگل‌ها و بیماری‌های ناشی از آن‌ها مطرح است [۱۱].

نانوذرات نقره در زمین های مختلف دارویی و پزشکی، صنایع نساجی، سرامیک‌های بهداشتی، تصفیه آب، رنگ، کشاورزی، دامپروری و در کامپوزیت‌های پلیمری به‌منظور کاربردهای صنعتی، خانگی و انواع فیلترهای آب کاربرد دارد [۱۲]. با ظهور مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌های مختلف نانوذرات نقره، امید تازه‌ای برای درمان عفونت‌های انسانی به وجود آورد است [۱۳].

اثرات ضدمیکروبی نقره با کوچک‌شدن سایز آن‌ها در سطح نانو افزایش می‌یابد. پارتیکل‌های نانونقره، خوشه‌هایی از اتم‌های نقره به قطر ۱ تا ۱۸۸ نانومتر هستند که با اتصال به پروتئین حاوی گوگرد در سطح غشای میکروارگانیسم‌ها، وارد آن‌ها شده و با تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشا و تأثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی درنهایت به مرگ سلولی منجر می‌شود [۱۴]. باتوجه‌به خواص مختلف این نانوذره، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدلیشمانیایی نانوذرات نقره بر انگل لیشمانیاماژور در محیط کشت آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی

کشت انگل لیشمانیاماژور

پس از تهیه سویه استاندارد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) از انستیتو پاستور ایران[2]، در محیط کشت دو فازی (Novy-Nicolle-Mac Neal (NNN کشت داده شد. پس از آن برای تهیه تکثیر انبوه به محیط کشت RPMI-1640 (سیگما- آمریکا) به‌همراه آنتی‌بیوتیک‌ها، ازجمله پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (گیبکو-آمریکا) و ۲۰ درصد سرم جنین گاوی، انتقال یافت. فلاسک‌های محیط کشت داخل انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد منتقل و روزانه با میکروسکوب معکوس (اینورت) بررسی شد.

ویژگی‌های نانوذرات نقره[3] و تهیه غلظت‌های مختلف آن

نانوذرات نقره پودر سیاه رنگی است که از شرکت نانو مواد پیشگامان ایران خریداری شد. اندازه ذرات نقره ۲۵-۱۰۰ نانومتر، چگالی واقعی آن ۱۰/۵ g/cm3 و خلوص آن ۹۹/۹۹ درصد بود. خصوصیات آن توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی[4] و میکروسکوپ الکترونی انتقالی[5] مشخص شد. از نانوذرات نقره غلظت‌های ۰/۷۵ تا ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر با حل کردن آن در آب‌مقطر تهیه شد. نانوذره رقیق‌شده به‌وسیله فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون با قطر ۲۵ میلی‌لیتر ساخت سارتریوس آلمان استریل شد.

بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور و تعیین IC50

برای بررسی اثر کشندگی نانوذرات نقره، روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور، 10^6 عدد انگل در فاز لگاریتمی، تحت مواجهه با غلظت‌های ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۶، ۱۲،

1. Phlebotominae

2. Pasteur Institute of Iran
3. Synthesis of Silver nanoparticles Synthesis of Silver nanoparticles (Ag Nps)
4. Scanning Electron Microscope (SEM)
5. Transmission Electron Microscope (TEM). Leo 906, Zeiss 100 KV, Germany

۲۴، ۴۸ و ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، قرارگرفت. از گلوکانتیم و آب‌مقطر به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. برای هر غلظت و نیز برای کنترل مثبت و منفی، سه فلاسک درنظرگرفته شد. تمامی گروه‌ها در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد انگل‌های زنده توسط تریپانبلو و با استفاده از لام‌نئوبار و میکروسکوپ نوری (به روش هموسایتومتری مورد شمارش قرار گرفت. میزان کشندگی برای هر یک از غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر روی پروماستیگوت‌های انگل، توسط فرمول شماره ۱ محاسبه شد:

1.

GI=(a-b/a)

که در آن a: تعداد انگل‌های زنده در نمونه کنترل منفی و b: تعداد انگل‌های زنده در نمونه حاوی نانوذرات نقره است. سپس با استفاده از نسخه ۱۳ نرم‌افزار سیگما پلات تمام واکنش‌ها به حداقل غلظتی که باعث مهار رشد ۵۰ درصد انگل می‌شود، برای عصاره فوق محاسبه شد.

روش بررسی آماری

در این مطالعه، کلیه داده‌ها در نرم‌افزار اکسل وارد شد تا نتایج حاصل از آن به‌عنوان میانگین و انحراف‌معیار گزارش شود. از نسخه ۱۳نرم‌افزارسیگما پلات(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) نیز برای محاسبه میزان حداقل غلظتی از نانوذرات نقره که باعث مهار رشد ۵۰ درصد (IC50) انگل می‌شود، استفاده شد.

یافته‌ها

تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت با پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی موردمطالعه قرارگرفت. آزمون آنالیز واریانس مشاهدات تکرارشده نشان داد که باتوجه‌به اثرات متفاوت نانوذرات نقره روند کاهشی معناداری در تعداد انگل‌های لیشمانیا برحسب زمان وجود دارد (P≤۰/۰۵).

مقدار IC50 نانوذرات نقره پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی لیشمانیا ماژور ۳۶/۶۷، ۲۷/۲ و ۲۱/۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه‌شد. بالاترین کشندگی ۱۰۰ درصد، در غلظت ۹۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بعد از ۷۲ ساعت مواجهه، مشاهده شد. تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا در مقابل غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در جدول شماره ۱ و میزان ممانعت از رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا در مقابل غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. میانگین درصد کشندگی نانوذرات نقره بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. تصویر ۲ و ۳ به‌ترتیب تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی از نانوذرات نقره را نشان می‌دهند.

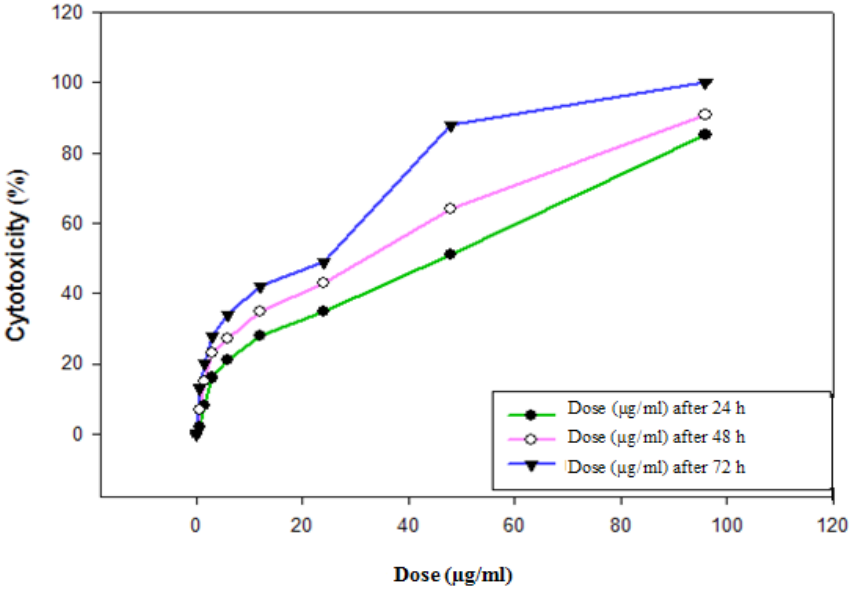
بحث

براساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی[6]، حدود ۱۴ میلیون

6. World Health Organization (WHO)

جدول ۱. تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا در مقابل غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بعد از انکوباسیون

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	P
۰/۷۵	۱۸۲۳	۳۶۶۶	۴۹۶۷	۰>/۰۰۰۴
۱/۵	۱۷۱۲	۳۳۵۱	۴۵۶۸	
۳	۱۵۶۳	۳۰۳۶	۴۱۱۱	
۶	۱۴۷۰	۲۸۷۸	۳۷۶۸	
۱۲	۱۳۳۹	۲۵۶۲	۳۳۱۱	
۲۴	۱۲۰۹	۲۲۴۷	۲۹۱۲	
۴۸	۹۱۱	۱۴۱۹	۶۸۵	
۹۶	۲۷۹	۳۵۴	۰	
کنترل مثبت	۰	۰	۰	
کنترل منفی	۱۸۶۱	۳۹۴۳	۵۷۱۰	



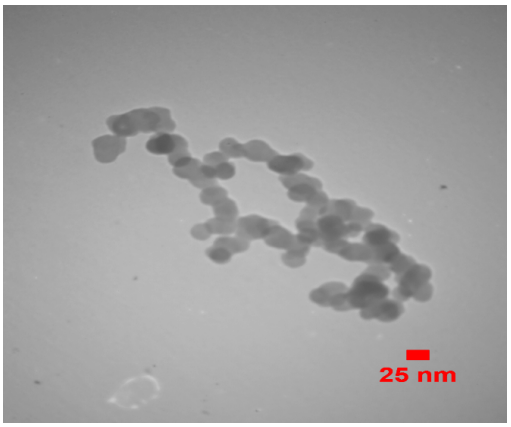
تصویر ۱. میانگین درصد کشندگی نانوذرات نقره بر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور

نفر در آفریقا، آسیا، اروپا و آمریکا مستقیماً تحت‌تأثیر بیماری لیشمانیوز قرار دارند [۱۵]. آنتیموان به‌عنوان اصلی‌ترین داروی مورداستفاده برای درمان لیشمانیوز توصیه شده است، اما در این مورد محدودیت‌هایی مانند هزینه‌های بالا، عوارض جانبی، تزریق مکرر و اثربخشی ناقص وجود دارد؛ بنابراین تهیه داروی ضدلیشمانیوز جدید یکی از ضروری‌ترین نیازهاست.

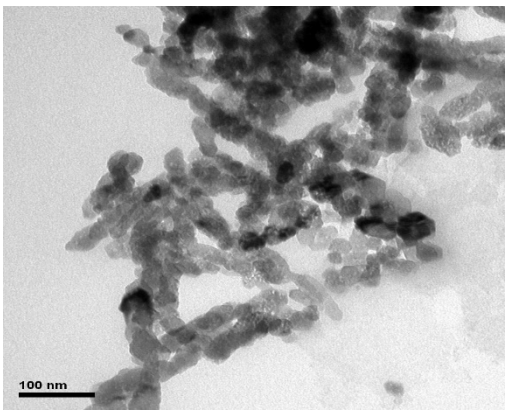
هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضدلیشمانیایی نانوذرات نقره روی لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج آن نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف اثر بازدارندگی بر رشد لیشمانیا ماژور دارند و غلظت ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره دارای بیشترین اثر ضدلیشمانیایی ۱۰۰ درصد در زمان مواجهه ۷۲ ساعته بود. نانوذرات نقره با اتصال به گروه‌های

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور بعد از انکوباسیون

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	درصد			P
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	
۰/۷۵	۲	۷	۱۳	۰>/۰۰۰۰۲۱
۱/۵	۸	۱۵	۲۰	
۳	۱۶	۲۳	۲۸	
۶	۲۱	۲۷	۳۴	
۱۲	۲۸	۳۵	۴۲	
۲۴	۳۵	۴۳	۴۹	
۴۸	۵۱	۶۴	۸۸	
۹۶	۸۵	۹۱	۱۰۰	
کنترل منفی	۰	۰	۰	
کنترل مثبت	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	



تصویر ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی از ذرات نقره (اندازه ۲۵ نانومتر)



تصویر ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی از ذرات نقره (اندازه ۱۰۰ نانومتر)

سولفور و فسفر و نیز ازطریق آزاد کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند به انگل لیشمانیا آسیب وارد کنند [۱۶].

مایلی‌فر و همکاران، پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور را با نانوذرات نقره به‌مدت ۱ساعت انکوبه کردند و سپس ۸ پالس الکتریکی توسط یک دستگاه الکتروپوریتور نمونه‌ها اعمال شد و نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که حضور نانوذرات نقره و اعمال همزمان پالس‌های الکتریکی، افت معناداری در کاهش بقای انگل فراهم می‌کند [۱۷]. اختری و همکاران، برای درمان زخم‌های لیشمانیوز ناشی از لیشمانیا ماژور از ملیتین فعال‌شده به‌همراه لیپوزوم و نانوذرات آلبومین استفاده کردند و نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که اندازه زخم‌ها در این گروه، به‌طور چشمگیری کاهش پیدا کرد [۱۸].

مطالعه کاسا[7] و همکاران نشان داد که نانوذرات آلبومین حاوی آمفوتریسین‌بی، سمیت دارو را کاهش داده و نیز سمیت بافتی دارو برای بافت‌های کبد، طحال، قلب و کلیه کاهش پیدا می‌کند و این دارو را جایگزینی برای آمفوتریسین‌بی معرفی کردند [۱۹]. در یک بررسی دیگر، حداد و همکاران، اثر ضدلیشمانیایی نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با کورکومین را بر روی لیشمانیا ماژور و اینفانتوم در شرایط برون‌تنی مطالعه کردند و شمارش تعداد انگل‌ها نشان داد که نانوذره سنتزشده، اثر مطلوبی در ممانعت از رشد لیشمانیا ماژور و اینفانتوم دارند [۲۰].

نتایج مطالعه‌ای دیگر که توسط ترابی و همکاران، انجام شد، نشان داد که نانوذرات طلا تعداد آماستیگوت لیشمانیا ماژور را در زخم لیشمانیایی کاهش می‌دهند و میزان مرگ‌ومیر موش‌ها نیز کاهش پیدا می‌کند [۲۱]. اثرات نانوذرات سلنیوم بر لیشمانیا اینفانتوم توسط سفلایی و همکاران مورد بررسی قرار گرفت و میزان IC50 نانوذرات علیه آماستیگوت و پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم به‌ترتیب ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد؛ مقایسه نتایج مطالعه سفلایی با مطالعه حاضر نشان داد که اثر ضدلیشمانیایی (علیه لیشمانیا اینفانتوم) نانوذرات سلنیوم نسبت به نانوذرات نقره بیشتر است [۲۲].

7. Casa

در مطالعه‌ای که توسط فیض‌آبادی و همکاران با هدف بررسی اثرات ضدلیشمانیایی نانوذره کیتوزان همراه پروتئین‌های دفعی -ترشحی لیشمانیا ماژور بر میزان آپوپتوز ماکروفاژها انجام گرفت نشان داد که کیتوزان می‌تواند ازطریق کاهش آپوپتوز، توانایی ماکروفاژهای آلوده را در حذف انگل افزایش دهد [۲۳].

سازگارنیا و همکاران، مطالعه‌ای با هدف تعیین اثربخشی گرمادرمانی درحضور نانوذرات طلا و تشعشعات مایکروویو بر بقای پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که حضور نانوذرات طلا در طول تابش مایکروویو برای پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌ها کشنده‌تر است؛ بنابراین گرمادرمانی با استفاده از پرتوهای مایکروویو در حضور نانوذرات طلا ممکن است به‌عنوان یک رویکرد جدید برای درمان پیشنهاد شود [۲۴].

جامعی و همکاران در یک بررسی، اثر ضدلیشمانیایی نانوذرات سلنیوم و نقره در بهبودی زخم ناشی از لیشمانیا ماژور را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که قطر زخم‌های گروه تحت درمان با نانوسلنیوم اختلاف معناداری با گروه شاهد نشان نداد ولی قطر زخم‌های گروه تحت درمان با نانونقره اختلاف معناداری با گروه شاهد نشان داد ولی بزرگ‌تر از گروه تحت درمان با گلوکانتیم (کنترل مثبت) بود [۲۵].

در مطالعه بایوکو و همکاران که اثر کشندگی نانوذره نقره، بر ضدلیشمانیوز احشایی ارزیابی‌شده، نتایج نشان داد که نانوذره نقره نسبت‌به ترکیبات آنتی‌موان تأثیر بیشتری در کشندگی لیشمانیا دارد [۲۶]. در مطالعه مروری علمی و همکاران، آن‌ها عنوان کردند که نانوذره نقره، طلا، کیتوزان و اکسیدفلزات بر روی لیشمانیا اثر کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارند [۲۷].

در مطالعه جبلی و همکاران که تأثیر نانوذره نقره، طلا، دی‌اکسیدتیتانیوم، دی‌اکسیدروی و دی‌اکسیدمنیزیم زیر نور ماوراءبنفش، مادون قرمز و شرایط تاریکی را ارزیابی کردند و نشان دادند که بیشترین فعالیت ضدلیشمانیایی را نانوذره نقره دارد و نور ماوراءبنفش و مادون‌قرمز نیز هر دو دارای فعالیت ضدلیشمانیایی هستند [۲۸].

خدراگی و همکاران، نانوذرات نقره با استفاده از عصاره برگ مورینگا اولیفرا بیوسنتز کردند و بررسی فعالیت ضدلیشمانیایی این نانوذرات در مدل موشی عفونت لیشمانیا ماژور بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که تیمار با نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره مورینگا اولیفرا دارای اثر بالینی بالاتر و سریع‌تری نسبت‌به تیمار آنتی‌مونیال پنج ظرفیتی استاندارد است، احتمالاً به‌دلیل افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی است [۲۹]. متفاوت بودن نتایج بررسی‌های مختلف، ناشی از متفاوت‌بودن نانوذرات، تفاوت در واحدهای اندازه‌گیری مانند میکروگرم، میلی‌گرم و غیره است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تمامی غلظت‌های نانوذرات نقره دارای فعالیت ضدلیشمانیایی بوده و غلظت ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره دارای بیشترین اثر ضدلیشمانیایی ۱۰۰ درصد در زمان مواجهه ۷۲ ساعته است. بااین‌حال، برای تعیین کارایی نانوذرات نقره، تحقیقات بیشتری در شرایط درون‌تنی نیاز است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله برگفته از پایان‌نامه دکترای عمومی سرکار خانم دکتر فریبا سهرابی دانشجوی رشته پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی قم است که با کد اخلاق IR.MUQ.REC.1400.177 به انجام رسیده است.

حامی مالی

این پژوهش از کمک مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی قم در قالب گرنت پژوهشی بهره برده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی قم بابت کمک‌های مالی که در قالب گرنت پژوهشی ارائه داده است قدردانی می‌کنند.

References

[1] Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Scienc. 2005; 309(5733):436-42. [DOI:10.1126/science.1112680] [PMID] [PMCID]

[2] Mohammadi Azni S, Nokandeh Z, Khorsandi AA, Sanei Dehkordi AR. [Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Damghan district(Persian)].J Mil Med. 2010; 12(3):131-135. [Link]

[3] Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2015; 9: 588-596. [DOI: 10.3855/jidc.6833] [DOI:10.3855/jidc.6833] [PMID]

[4] Katakura K. Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). Curr Opin Infect Dis. 2009; 22(2):126-130. [DOI:10.1097/QCO.0b013e3283229ff2] [PMID]

[5] Mirzaei F, Norouzi R, Siyadatpanah A, Mitsuwan W, Nilforoushzadeh M, Maleksabet A, et al. Butanol Fraction of Kelussia odoratissima Mozaff Inhibits the Growth of Leishmania major Promastigote and Amastigote. World's Vet J. 2020; 10(2):254-259. [DOI:10.36380/scil.2020.wvj33]

[6] Awad MA, AL Olayan EM, Siddiqui M I, Merghani NM, Alsaif SS, Loufi AS. Antileishmanial effect of silver nanoparticles: Green synthesis, characterization, in vivo and in vitro assessment. Biomed Pharmacother. 2021; 137:111294. [DOI:10.1016/j.biopha.2021.111294] [PMID]

[7] Saleem K, Khursheed Z, Hano C, Anjum I, Anjum S. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: a focus on recent advances and challenges, Nanomater. 2019; 9(12):1749.[DOI:10.3390/nano9121749] [PMID] [PMCID]

[8] Firooz A, Mortazavi H, Khamesipour A, Ghiasi M, Abedini R, Balighi K, et al. Old world cutaneous leishmaniasis in Iran: clinical variants and treatments. J Dermatol Treat. 2020; 1:11. [DOI:10.1080/09546634.2019.1704214] [PMID]

[9] Sampaio RNR, Lucas IC, Costa Filho AVD. The use of azythromycin and N-methyl glucamine for the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) amazonensis in C57BL6 mice. Anais brasileiros de dermatologia. 2009; 84(2):125-128. [DOI:10.1590/S0365-05962009000200004] [PMID]

[10] Khan MA, Maruno M, Khaskhely NM, Ramzi ST, Hosokawa A, Uezato H, et al. Inhibition of intracellular proliferation of Leishmania parasites in vitro and suppression of skin lesion development in BALB/c mice by a novel lipid A analog (ONO-4007). Am J Trop Med Hyg. 2002; 67(2):184-190. [DOI:10.4269/ajtmh.2002.67.184] [PMID]

[11] Underwood C, Van Eps AW. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. Vet J. 2012; 193(1):12-23. [DOI:10.1016/j.tvjl.2012.01.002] [PMID]

[12] Rafique M, Sadaf I, Rafique MS, Tahir MB. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017; 45(7):1272-91. [DOI:10.1080/21691401.2016.1241792] [PMID]

[13] Abdelghany TM, Al-Rajhi AM, Al Abboud MA, Alawlaqi MM, Ganash Magdah A, Helmy EA, et al. Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: about future directions. A Rev BioNanosci. 2018; 8(1):5-16. [DOI:10.1007/s12668-017-0413-3]

[14] Khodashenas B, Ghorbani HR. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. Arab Chem. 2019; 12(8):1823-38. [DOI:10.1016/j.arabjc.2014.12.014]

[15] Igbineweka O, Aghedo F, Idusuyi O, Hussain N. Evaluating the efficacy of topical silver nitrate and intramuscular antimonial drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Sokoto, Nigeria. Afr J Clin Exp Microbiol. 2012; 13(2):90-97. [DOI:10.4314/ajcem.v13i2.6]

[16] Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. Int J Nanomedicine. 2011; 6:2705-14. [DOI:10.2147/IJN.S23883] [PMID] [PMCID]

[17] Mayelifar K, Sazgarnia A, Yadegari Dehkordi S, Eshghi H, Attaran N, Soudmand S, et al. [Inhibitory effect of electroporation and silver nanoprticles on the growth of leishmania major promastigotes: Influence of pulse duration (Persian)]. MJMS. 2013; 56(4): 247-254. [DOI:10.22038/mjms.2013.1762]

[18] Akhzari S, Nabian S, Shayan P, Taheri M. [Evaluation of the Effect of Liposome Carriers and Albumin Nanoparticles Containing Activated Melittin on Inhibiting the Growth of Leishmania Major Amastigote in vivo (Persian)]. sjimu. 2021; 29(6):36-47 [DOI:10.52547/sjimu.29.6.36]

[19] Casa DM, Scariot DB, Khalil NM, Nakamura CV, Mainardes RM. Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. Exp Parasitol. 2018; 192:12-8. [DOI:10.1016/j.exppara.2018.07.003] [PMID]

[20] Haddad A, Delavari M, Arbabi M, Gardeshmeydani I, Salmani A. [Evaluation of anti-leishmaniasis activity of curcumin-loaded chitosan nanoparticles on Leishmania major and L. infantum in vitro (Persian)]. Feyz. 2021; 25 (4) :1040-46. [Link]

[21] Torabi N, Mohebali M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Edrissian GH, Esmaeili J, Charehdar S. 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. JPHS. 2011; 1:15-8. [DOI:10.13140/2.1.4561.9840]

[22] Soflaei S, Dalimi A, Abdoli A, Kamali M, Nasiri V, Shakibaie M, et al. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on Leishmania infantum. Comp Clin Path. 2014; 23(1):15-20. [DOI:10.1007/s00580-012-1561-z]

[23] Feizabadi E, Zavaran Hosseini A, Soudi S, Khosrojerdi A. [Studying the role of chitosan nanoparticle loaded with Leishmania major Secretory and excretory antigens on the number of apoptotic macrophages in parasite sensitive mouse (Persian)]. Danesh Med. 2020; 26(6): 9-18. [Link]

[24] Sazgarnia A, Taheri A R, Soudmand S, Jafari Parizi A, Rajabi O, Sadat Darbandi M. Antiparasitic effects of gold nanoparticles with microwave radiation on promastigotes and amastigotes of Leishmania major. Int J Hyperth. 2013; 29(1): 79-86. [DOI:10.3109/02656736.2012.758875] [PMID]

[25] Jameii F, Dalimi Asl A, Karimi M, Ghaffarifar F. [Healing Effect Comparison of Selenium and Silver Nanoparticles on Skin Leishmanial Lesions in Mice (Persian)]. Avicenna J Clin Med. 2015; 22(3):217-223. [Link]

[26] Baiocco P, Ilari A, Ceci P, Orsini S, Gramiccia M, Di Muccio T, Colotti G. Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and Leishmania infantum proliferation. ACS Med Chem Lett. 2010; 2(3):230-3. [DOI:10.1021/ml1002629] [PMID] [PMCID]

[27] Elmi T, Gholami S, Fakhar M, Azizi F. [A Review on the Use of Nanoparticles in the Treatment (Persian)]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 23(102):126-133. [Link]

[28] Jebali A, Kazemi B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. Toxicol Vitro. 2013; 27(6):1896-904. [DOI:10.1016/j.tiv.2013.06.002] [PMID]

[29] El-Khadragy M, Alolayan EM, Metwally DM, El-Din MFS, Alobud SS, Alsultan NI, et al. Clinical efficacy associated with enhanced antioxidant enzyme activities of silver nanoparticles biosynthesized using Moringa oleifera leaf extract, against cutaneous leishmaniasis in a murine model of Leishmania major. Int J Environ Res. 2018; 15(5):1037. [DOI:10.3390/ijerph15051037] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank