

Applications of Nanoscopic Technology in Protozoal Infections

Azar Shokri¹,
Mahdi Fakhar²,
Javad Akhtari³,
Pooria Gill³

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).

کاربرد های فناوری نانو سکوپي در عفونت های تک یاخته ای

آذر شکری^۱مهدی فخار^۲جواد اختری^۳ پوریا گیل^۳

چکیده

شناسائی مواد در ابعاد نانومتری توسط میکروسکوپ های دقیق یا همان نانوسکوپي، به فهم بهتر فیزیولوژی سلول ها منجر شده و یکی از راه های موجود برای ارزیابی تغییرات ایجاد شده توسط عوامل فیزیکی و شیمیائی در سطح سلول می باشد. با توجه به پیشرفت های اخیر در حوزه نانو، ابزارهای نانوسکوپي برای بررسی خصوصیات فراساختاری، اقدامات تشخیصی و پژوهش های دارویی در حوزه انگل شناسی، به ویژه تک یاخته های بیماری زا مانند پلاسمودیوم و لیشرمانیا، رشد چشمگیری داشته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی کاربردهای فناوری نانوسکوپي در مطالعات انجام شده بر روی عفونت های تک یاخته ای با تأکید بر انگل لیشرمانیا انجام گرفته است. در این مطالعه که از نوع مروری غیر نظام مند می باشد، جستجو با کلید واژه های نانوسکوپي، AFM, STM، تک یاخته های پاتوژن، لیشرمانیا، نانوتکنولوژی، به صورت تکی و ترکیبی در پایگاه های اطلاعاتی PubMed, Google Scholar, 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 فناوری های نانوسکوپي به ویژه میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) Atomic Force Microscopy، ابزار قدرتمند و کارآمد در تشخیص دقیق جزئیات فراساختاری تک یاخته ها به ویژه انگل لیشرمانیا می باشند. لذا از این روش ها می توان به عنوان روش های تکمیلی در کنار روش های قدیمی میکروسکوپ الکترونی مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و عبوری (TEM) استفاده نمود.

واژه های کلیدی: نانوتکنولوژی، نانوسکوپي، AFM، تک یاخته، لیشرمانیا

مقدمه

محدودیت حد تفکیک تصاویر در میکروسکوپ های نوری دانست. این محدودیت به دلیل اندازه ی طول موج پرتوهای نور مرئی ایجاد می شود، زیرا طبق قوانین فیزیک، نمی توان به حد تفکیک کم تر از نصف طول موج نور (مرئی) یعنی ۲۰۰ نانومتر رسید. با استفاده از باریکه الکترونی به جای نور، این محدودیت برطرف

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، سابقه ای بسیار طولانی دارد. از نظر تاریخی، دلیل روی آوردن به استفاده از الکترون ها را باید در

E-mail: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاه پیامبراعظم، دانشکده پزشکی

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، مرکز تحقیقات 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

شد که ظهور میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron Microscope) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron Microscope) را شاهد بودیم و تکنیک های جدیدتر روبشی در حال پیشرفت است (۲). شناخت مواد در ابعاد نانومتری با بهره گیری از روش های نوین میکروسکوپی، منجر به پیدایش شاخه جدیدی به نام نانوسکوپی شده است. لغت نانو از ریشه یونانی dwarf به معنای کوتوله گرفته شده و به عنوان یک پیشوند، کاربرد زیادی در علوم مختلف پیدا نموده است. این حوزه با توانائی ساخت ذراتی به قطر ۱-۱۰۰ نانومتر و با هدف ساخت ذرات جدید با خواص و عملکردهای متفاوت، معرفی گردید (۳). خواص نانومکانیکی و نیروهای در ابعاد نانو که منتج از ریزمحیط سلولی (Microenvironment) می باشند، تأثیر قابل توجهی بر فیزیولوژی و عملکرد سلول ها و ارگانیسم های زنده دارند. امروزه معلوم شده است که سلول ها قادر به پاسخ دهی به گستره وسیعی از علائم نانومکانیکی ریزمحیط خود می باشند. سیگنال های فیزیکی و بیوشیمیائی فراوانی در زمان سلامتی و بیماری سلول ها ایجاد می گردند. نه تنها سلول های پستانداران، بلکه سلول های گیاهی و حتی سلول های میکروبی و قارچ ها، به فشارهای نانومکانیکی عکس العمل نشان می دهند و این پاسخ ها برای عملکرد فیزیولوژیک آنها ضروری است (۴). این عکس العمل به طور روشنی در محدوده سلولی وجود دارد و مبین آن است که عوامل فیزیکی، نقش اساسی در تنظیم و تعدیل مراحل بیولوژیک سلول ها دارند. ریزمحیط سلولی، ساختار پیچیده ای دارد که در آن سلول ها توسط شبکه های فضائی متنوعی از مولکول های زیستی، پروتئین ها و مایعات محصور شده اند. در این محیط، سلول ها توسط مکانیسم هایی، خواص فیزیکی و نیروهای مکانیکی محیط پیرامون خود را احساس می نمایند.

اندکی پس از اختراع میکروسکوپ نوری و در مشاهدات اولیه سلول های زنده، مشخص شده بود که

سلول ها، قابلیت ذاتی درک و پاسخ دهی به تحریکات نانومکانیکی را دارا می باشند. پیشرفت های اخیر در حوزه میکرونانو، درک مکانیسم های مولکولی که باعث واکنش سلول ها به عوامل مکانیکی می گردد را ممکن ساخته است. به علاوه، راه را برای مطالعه این عوامل، هموار نموده است. در حال حاضر، ابزارهای بیوفیزیکی بسیار کمی برای اندازه گیری مستقیم خصوصیات مکانیکی و دینامیک سلول های زنده در ابعاد نانو و نیز شناسایی پروتئین های سطحی سلول ها در حد تک مولکول وجود دارد. کاربرد نانوذرات در علوم مختلفی هم چون فیزیک و شیمی و متالورژی، شاخه های جدیدی از علوم را ایجاد کرده است. دانش پزشکی هم در این زمینه بی بهره نمانده و بدین ترتیب، نانومدیسین (Nanomedicine) پایه گذاری شده است. البته حوزه نانوپزشکی بسیار فراتر از کاربرد نانوذرات می باشد. در حالی که نانومدیسین، قادر به ایجاد تغییر در درمان های پزشکی می باشد، پیچیدگی های انسان و سایر ارگانیسم ها، این حوزه از علم را به چالشی بحث بر انگیز مبدل نموده است. در حال حاضر، این حوزه تأثیر زیادی بر تحقیقات زیست پزشکی با استفاده از روش های تجربی جدید در مطالعات برون تنی دارد (۵،۶). این تکنولوژی گام های موثری در شناسائی بهتر عوامل عفونی و انگلی مانند سالمونلا، لیستریا، توبرکلوزیس، HIV و همچنین انگل های مالاریا و لیشرمانیا و تحقیقات مربوط به ساخت واکسن آنها بر داشته است. میکروسکوپ های فلورسانس و الکترونی شامل TEM, SEM, STM, AFM و SNOM، منجر به شناخت بهتر ساختار سلول ها و ارگانیسم های زنده در محیط های بیولوژیک و واکنش آنها به تغییرات فیزیکیوشیمیائی محیط پیرامونشان شده است. اطلاعات ساختاری از طریق روش های میکروسکوپ الکترونی عبوری یا همان TEM و میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM، حاصل می شود. SEM یکی از پرکاربردترین ابزارها در زمینه بررسی مورفولوژی میکروسکوپی و آنالیز ترکیب شیمیائی مواد می باشد. میکروسکوپ تونل زنی روبشی

(Scanning Tunneling Microscopy-STM) اولین وسیله برای تهیه تصاویر در فواصل حقیقی سطوح با وضوح اتمی می‌باشد و پس از آن میکروسکوپ نیروی اتمی (Atomic Force Microscopy- AFM) که قادر به ترسیم انواع نیروها مانند نیروهای مغناطیسی و الکترواستاتیکی می‌باشد و برهم کنش‌های شیمیایی را جستجو می‌نماید، قرار می‌گیرد. ابزارهای نانوسکوپی به کار گرفته شده در حوزه انگل شناسی مانند روش‌های اسپکتروسکوپی و میکروسکوپی جدید و در رأس آن‌ها اخیراً AFM، امکان بررسی تغییرات فراساختاری تعدادی از انگل‌ها تحت تأثیر این عوامل را به سهولت امکان‌پذیر نموده است. مشاهده تأثیر نانوذرات با کمک این روش میکروسکوپی، به پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه بیولوژی انگل‌ها منجر شده و مسیر مقابله با انگل‌ها را هموارتر از پیش نموده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی کاربردهای فناوری نانوسکوپی در مطالعات انجام شده بر روی تک یاخته‌های انگلی با تأکید بر انگل لیشمانیا انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که از نوع مروری غیر نظام مند می‌باشد، جستجو با کلید واژه‌های نانوسکوپی، AFM، STM، تک یاخته‌های پاتوزن، لیشمانیا، روش تشخیص، نانوتکنولوژی و لیشمانیازیس، به صورت تکی و ترکیبی در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed، Google scholar، Web of Science، Iranmedex، Magiran، Scopus یک بازه زمانی از سال ۱۹۸۸ تا سال ۲۰۱۴ انجام شده و مقالات مرتبط با موضوع، انتخاب و مطالعه شدند.

اساس تصویربرداری با فلونورسانس نانوسکوپی

نانوسکوپی نوری (فلونورسانس نانوسکوپی)، امکان شناسایی عوامل در حد نانو را با کمک ابزاری مانند میکروسکوپ فلورسنت فراهم می‌کند. این ابزار وسیله‌ای بسیار ارزشمند در دانش بیولوژی به علت

توانایی آن در تصویرگیری غیرتهاجمی از درون سلول 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 پروتئین‌های سیتوزولی با وضوح فضائی بی‌نظیر به نمایش گذاشته است. تکنیک‌های تصویرگیری با وضوح فوق‌العاده، شدیداً وابسته به پروب‌های فلورسنت درخشان همانند رنگ‌های آلی یا پروتئین‌های فلورسنت می‌باشد. اخیراً این روش‌ها به تصویربرداری سه بعدی سلول‌های زنده گسترش یافته است و لذا وضوح فضائی-زمانی بدیعی را به منظور تصویربرداری از ابعاد ریزسلولی در محدوده چند صد نانومتر ایجاد نموده است (۹۸). این موارد شامل تصویربرداری از پروتئین‌های داخلی غشاء سلول در محیط سلول‌های زنده بوده و می‌تواند از طریق استراتژی‌های خاص، به یک مولکول بسط یابد. امروزه میکروسکوپ‌های فلورسنت پویشی لیزری، هم کانون (Confocal) و مولتی فوتون، ابزارهای استاندارد را در عرصه تحقیق بیولوژی سلولی فراهم کرده‌اند. در مقایسه با تصویربرداری میدان گسترده (wide-field)، این استراتژی‌ها عدم تمرکز فلورسانس را از طریق برش‌های نوری معین درون نمونه کاهش می‌دهد. با این حال این کاربردهای مرسوم در برطرف نمودن نیروی چند صد نانومتری ناشی از انکسار نوری محدود می‌شود. این محدودیت اساسی وضوح (~ 250 nm)، مانع از دیدن ارگانل‌ها با اندازه کوچک‌تر از این محدوده می‌گردد (۹). پیشرفت‌های اخیر منجر به تکنیک‌های جدید این نوع میکروسکوپی شده و وضوح تصویر در مقیاس نانومتر را بهبود بخشیده است. باید توجه کرد که انکسار نور و تداخل امواج نور با بخش‌های نوری میکروسکوپ زمینه دور قابل پیشگیری نمی‌باشد. بنابراین در طی تصویربرداری، فلورسانس ساطع شده به شکل علائم گسترده شده فضائی ثبت می‌گردد.

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 هم‌کانون و مولتی‌فوتون، برش‌های نوری ایجاد می‌کردند، نمی‌توانستند بر موانع افتراق غلبه نمایند. این مسئله تا زمان اختراع میکروسکوپ نوری روبشی میدان نزدیک (Scanning Near Field Optical Microscopy- SNOM) ادامه داشت، مفهومی که در سال ۱۹۲۸ پایه‌گذاری و در ۱۹۸۰ ساخته شد. از نظر 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 Ernest Abbe انجام شد. این محاسبات می‌گوید که "کوچک‌ترین 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 هم‌همزمان 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 فلورسنت‌های 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. توانایی 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 به وجود آمد (۱۱). اساس این روش تصویربرداری، یک پروب نوک تیز برای نشان دادن خصوصیات سطوح می‌باشد. این پروب با نمونه مورد نظر برای به دست آوردن یک تصویر سه بعدی واضح برهم کنش انجام می‌دهد. این خصوصیت مربوط به نوک تیز پروب می‌باشد. جنس پروب و پایه‌ها (Cantilevers) معمولاً از سلیکون یا نیتريد سلیکون است که با تکنیک‌های مخصوصی به نام microfabrication تهیه می‌شود. این پروب‌ها به یک تراشه شیشه‌ای برای حمل شدن وصل

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 برهم‌کنش‌های 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 بالایی 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 به کار 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، آب‌گریزی، بار الکتریکی و نیز برای شناسایی رستپورها یا لیگاندها و مشخص کردن بعضی از خصوصیات اساسی فیزیکوشیمیایی 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 در طی 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 کارا تر می‌باشد. در این سبک، ارتفاع نمونه می‌تواند تنظیم شود تا انحراف دسته پروب از طریق یک لوپ

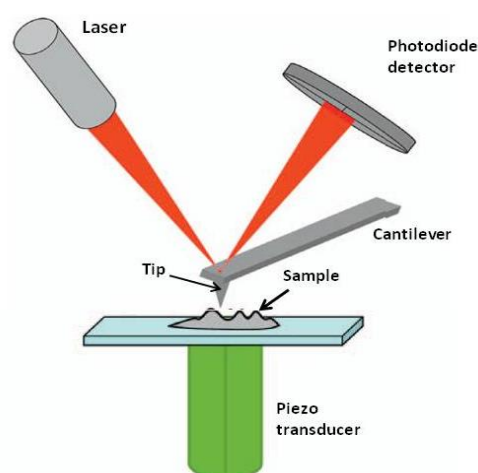
بازخورد ثابت نگه داشته شود. با این روش می‌توان تصویر پستی و بلندی‌های مربوط به زبری سطح نمونه و ضخامت یک لایه معین را به دست آورد. امروزه بیش‌تر از سبک ضربه‌ای (Tapping mode) که به نام روش تماس مداوم نیز شناخته می‌شود، به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود که در آن دسته پروب توسط یک نوسان ساز الکتریکی، مادام که سطح را اسکن می‌کند، با تناوبی نزدیک به تناوب رزونانس خود، تهیج 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 می‌آورد 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 می‌کند. این تماس، تأخیر فاز ناشی از اثر ویسکوالاستیک، چسبندگی و مکان‌نگاری 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. در مجموع مزیت مهم، امکان استفاده از پروب‌های مختلف برای اسکن کردن سطح می‌باشد. AFM می‌تواند همراه با Force Spectroscopy برای اندازه‌گیری نیروهای برهم‌کنش بین پروب و نمونه استفاده شود. اساساً Force Spectroscopy ثبت انحراف پروب در طی دوره فشردگی و انبساط کریستال پیزوالکتریکی است که وضعیت عمودی پروب را کنترل می‌نماید (۱۲) (تصاویر شماره ۱ و ۲).

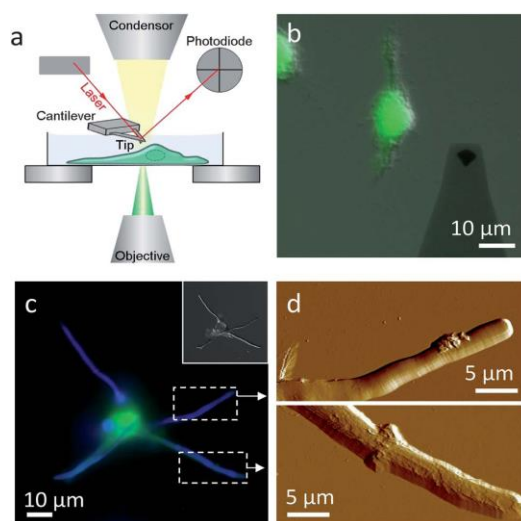
در روش AFM، علاوه بر این که نمونه‌ها نیاز به آماده‌سازی چندانی ندارند، تصویر سه بعدی از نمونه در مقیاس نانومتر ایجاد می‌شود و چون امکان مطالعه مولکول‌های زیستی و سلول‌ها در محیط فیزیولوژیک

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. به عبارتی 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 نانو اسکوپ از جمله AFM در حیطه 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، نمونه‌هایی از مطالعات انجام شده با تکنیک‌های نانو اسکوپ آورده شده است (۱۱، ۱۲ و ۲۹-۱۴).

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، قرار گرفتن 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).



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

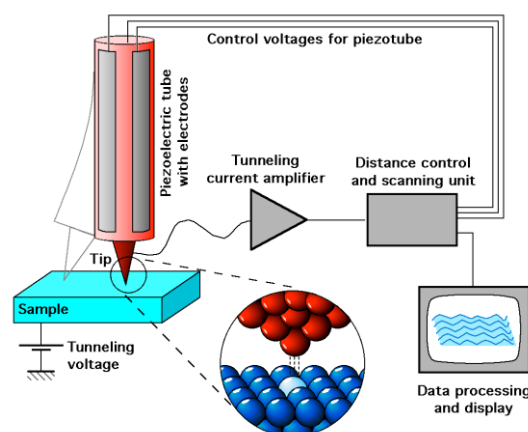


تصویر شماره ۲: اصول تصویربرداری با AFM و کاربرد آن در تصویربرداری از برهم کنش ماکروفاژ و یک پاتوژن. (a) تصویربرداری در مقیاس نانو ترکیبی از توانایی پیشرفته AFM با میکروسکوپ نوری. (b) تصویر میکروسکوپ نوری که کانتیلور AFM را همراه با ماکروفاژ زنده بر روی شیشه نشان می‌دهد که با رنگ سبز رنگ آمیزی شده است.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

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

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

اتم روی نمونه ارتباط برقرار می کند؛ لذا تیز بودن نوک پروب الزامی نیست، بر عکس روش AFM که ارتباط فضائی (سه بعدی)، از الزامات و ضروریات می باشد. عواملی که بر روی وضوح تصویر با STM تأثیر گذارند، موج بودن تصویر است و بسته به این که تراکم اتم های سطح نمونه چگونه در ارتفاع بالای سطح، تغییر می کند، وضوح تصویر نیز تغییر می نماید. دیگر این که STM مستقیماً وضعیت استقرار هسته را ردیابی نمی کند، بلکه بیش تر ردیاب تراکم اتمی می باشد، به همین دلیل تصاویر گرفته شده وضعیت قرار گرفتن اتم ها را نشان نمی دهد. تصویربرداری STM به خصوصیت سطح و بزرگی و وجود جریان تونلینگ بستگی دارد. از آن جا که STM از دورترین اتم سطح نمونه، تصویربرداری می نماید، به طور طبیعی نیاز به محیط با خلأ بالا دارد تا از عدم وجود هر نوع آلودگی سطح مثل پوشش مولکول های هوا یا



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 بدین شکل است که خارجی ترین اتم نوک پروب با نزدیک ترین

آب، اطمینان حاصل شود. بدین ترتیب 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 برهم‌کنش پروب و سطح ماده استفاده می‌شود، ولی AFM برای آنالیز سطح بسیاری از مواد مانند مواد بیولوژیکی به کار 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 شیمیایی 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. از طرفی 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).

اندازه‌گیری پتانسیل سطحی

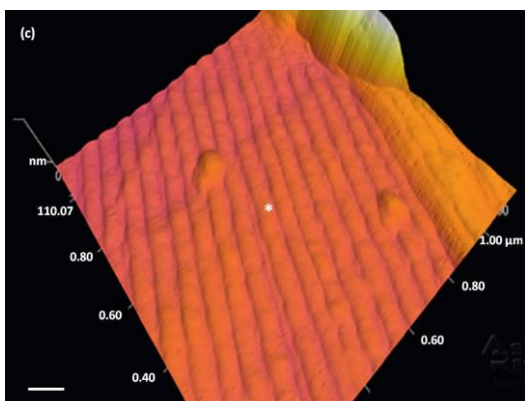
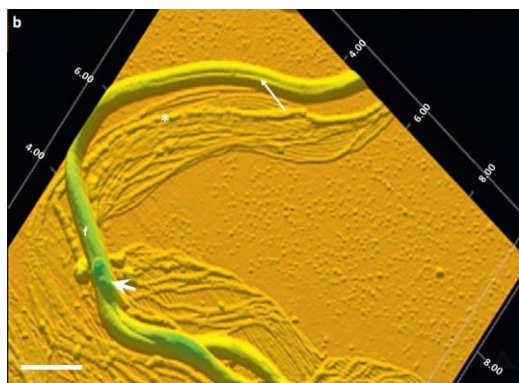
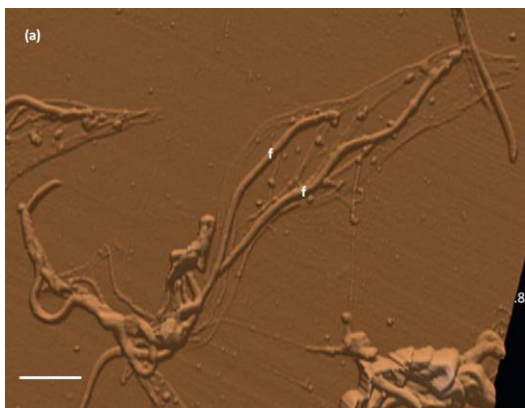
این نوع تصویربرداری که با سبک intermittent contact انجام می‌شود، اجازه ایجاد یک نقشه از پتانسیل الکترواستاتیک از سطح نمونه را می‌دهد. این نقشه بر اساس اختلاف پتانسیل سطح نمونه با پتانسیل نوک پروب ترسیم می‌شود. این نوع تصویربرداری اطلاعات مفیدی در مورد نمونه‌های بیولوژیک می‌دهد. در مورد تک یاخته‌های انگلی، 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 $+20 \text{ mV}$ 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 ($+65 \text{ mV}$) می‌باشند، 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 توکسوپلازما گوندی، آماسیتیگوت‌های لیشمانیا آمازوننسیس (*Leishmania amazonensis*)، پروماستیگوت‌های لیشمانیا آمازوننسیس و آماسیتیگوت‌های تریپانوزوما کروز (Trypanosoma cruzi) اندازه‌گیری شده است، به ترتیب $+90$ ، $+70$ ، $+130$ و 340 میلی‌ولت می‌باشد. این یافته‌ها، بعدها با الکتروفورز و اتصال ذرات کاتیونی به اثبات رسیدند (۱۴، ۱۷).

- طیف‌نگاری 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 می‌نماید. پیش از این، از این روش در قارچ‌ها استفاده شده است و به عنوان 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، خصوصیتی از غشاء مانند قرارگیری رسپتورها را بررسی کرد. این روش تصویرگیری بر اساس نقشه ارتجاعی سلول در مورد سلول‌های آلوده شده با انگل‌های توکسوپلازما گوندی و تریپانوزوما کروز با AFM، نشان داده که هر دو انگل به‌طور مشخصی سخت‌تر از سیتوپلاسم سلول محاصره‌کننده خود هستند. در مورد سلول آلوده به

بیانگر نقش عملکردی آن ها در تاژک می باشد (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 تصویر (a)، کل انگل مشاهده می شود و مراحل آغاز تقسیم سلولی را نشان می دهد و دو تاژک در یک سلول دیده می شود. در تصویر (b)، فلاژل و شکاف داخل آن در طول محور بزرگ دیده می شود و همین طور اتصال دهنده مشاهده می شود (فلش بزرگ تر). در تصویر (c)، میکروتوبول های ساب پلیکولار به خوبی با بزرگ نمایی بالا قابل 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.

توکسوپلازما گوندی، واکوئل پارازیتوفوروس دارای سختی کمتری نسبت به تاکی زوئیت انگل می باشد. روش طیف نگاری نیرویی در مورد آنتاموبا هیستولیتیکا نشان داده است که برهم کنش شدیدی بین سطح سلول و نوک پوشیده شده با کندروئیتین-۶- سولفات ایجاد می شود. نیرو در محدوده $nN/2$ اندازه گیری شده است. افزودن گالاکتوز به محیط، مقدار نیروی چسبندگی را کاهش می دهد. این بیانگر برهم کنش اختصاصی می باشد که احتمالاً به علت وجود لکترین اتصال گالاکتوز وان استیل گالاکتوز آمین (Galactose/N-acetyl-galactosaminelectin) است که بر روی سطح تک یاخته ظاهر می شود (۱۷، ۱۴).

کاربرد نانوسکوپی در انگل شناسی

- مشاهده سطح تاژک تک یاخته ها با میکروسکوپ نیروی اتمی

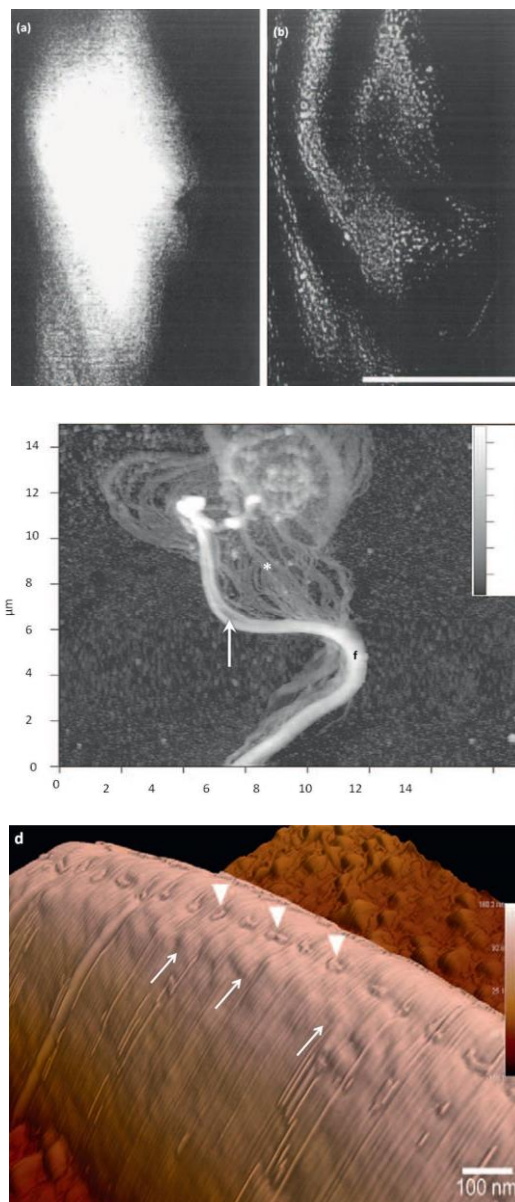
از این تکنیک جهت مطالعه تک یاخته های مهم انگلی مانند خانواده تریپانوزوما تیده (*Trypanosoma tidae*) استفاده شده است. در تک یاخته های انگلی تاژکدار، تاژک نقش مهمی در بیماری زائی انگل در بدن میزبان پستاندار دارد، بنابراین شناخت ساختار تاژک می تواند به عنوان اهداف جدید در مداخلات دارویی مدنظر قرار گیرد. در مطالعه ای، بررسی فراساختاری تریپانوزوما کروز، اطلاعات ارزشمندی را درباره ساختمان دقیق تاژک توسط روش AFM به دست داد. این روش تصویربرداری، وجود ساختارهایی که قبلاً شناخته نشده بودند، همانند فضاهای فاصله دار که اطراف شیار تاژک تشکیل می شود و در جهت طول محور تاژک بزرگ بین آگزنوم و paraflagellar rod (PFR) قرار دارد، را مشخص نمود. هرچند عملکرد و علت وجود آن ها فعلاً نامشخص می باشد. تاژکداران مختلف با این روش مورد بررسی قرار گرفتند، ولی این ساختار در تمامی آن ها مشاهده نشد. این نتایج نشان می دهند که وجود این فضاها در تاژکدارانی که PFR دارند، حتمی می باشد و

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 می‌کند. 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 در بسیاری از تحقیقات و مطالعات علمی، از این روش معتبر استفاده می‌گردد. 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-رستپور دست یافت (۲۴،۱۷).

- مشاهده ناب ها (تکمه‌های) پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*) در گلبول‌های قرمز با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

با استفاده از AFM، به اثبات وجود دو زیر واحد



تصویر شماره ۵: تصاویر فرم اپی ماستیگوت تریپانوزوما کروز. (a) تصویر گرفته شده با Intermittent contact mode از قسمتی از پیکر تریپانوزوما کروز. (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. میکروتوبول‌های ساب پلیکولار (علامت ستاره) و تاژک (f) نیز قابل مشاهده اند. (d) تصویر با Intermittent contact mode از تاژک سلولی که با دترجنت مجاورت داده شده است که در آن شکاف در امتداد محور بلند تاژک به خوبی مشاهده می‌شود با فرورفتگی‌ها سازمان یافته (نوک فلش‌ها). 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) می‌باشد.

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 شیمیایی 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 تارژک انگل تریپانوزوما، ساختار جدیدی که قبلاً در تارژک 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

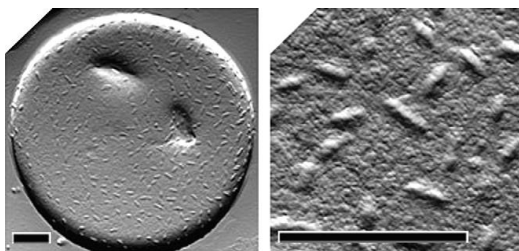
kDNA با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

اکتین لیشمانیا (LdACT) شکل غیرمعمول اکتین سلول‌های یوکاریوتیک بوده و از سایر اکتین‌ها در توانایی تشکیل شکل رشته‌ای در برابر توکسین‌ها و اتصال به دی‌ان‌آز ۱ (DNase-1) متمایز می‌گردد، حضور آن در سیتوپلاسم، نواحی قشری، تارژک، هسته و کینتوپلاست، به ارتباط آن با DNA کینتوپلاست (kDNA) اشاره می‌نماید. 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 پروکاریوتی متصل می‌گردد و خاصیت جداکنندگی خود را نشان می‌دهد و مشخص می‌نماید که LdACT می‌تواند نقش مهمی در تغییر شکل دادن kDNA داشته باشد. بدین منظور kDNA را با LdACT انکوبه و پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، تصویربرداری با روش AFM انجام شده و جزئیات اتصال مولکول‌های اکتین لیشمانیا (LdACT) و برهم‌کنش آن‌ها با توپوایزومراز به خوبی قابل مشاهده شده است (۲۳).

سنجش حساسیت و مقاومت لیشمانیا دونووانی 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 دونووانی پرداختند. بدین منظور از آندروگرافولید، نانوذره تهیه نموده (AG nanoparticles) و اندازه آن‌ها با (Photon Correlation Spectroscopy-PCS) زتاسایزر (Zetasizer) نانو مشخص گردید. پس از تهیه سوسپانسیون از این ذرات، آن‌ها 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).



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) بزرگ‌نمایی بیش‌تر همان سلول را در بخش b مورفولوژی با جزئیات بیش‌تر را نمایش می‌دهد. تصاویر در مجاورت هوا و با contact mode گرفته شده‌اند. در بخش a، مقیاس 1mm و در بخش b، مقیاس 500nm می‌باشد (۳۰).

AFM آنالیز مراحل تجمع خود به خود مولکول‌های کلاژن تیپ I در فیبریل‌ها می‌باشد. مثال دیگر، قابلیت مشاهده تحرک FtsZ به شکل برون تنی می‌باشد که اطلاعات جامعی درباره این که چگونه این مولکول‌های توبولین مانند، ساختارهای پلیمری تشکیل می‌دهند، را ارائه می‌نماید. این ساختارها نقش اساسی در تقسیم باکتری بر عهده دارند. در مورد تک یاخته‌های انگلی، با استفاده از AFM، شناسایی 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 ناقص به با برآمدگی‌های تسییحی و حلقه‌های ارتجاعی وجود دارد که اغلب به عنوان دایمر شناخته می‌شدند. هر چند ساختار منومر و مولتی مرهای بزرگ نیز شناسایی شده‌اند. از AFM جهت شناسایی 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 برهم کنش سر به دم غیر معمول هستند (۱۴).

- بررسی نانوذرات آندروگرافیل و آزادسازی آن به وسیله AFM در تشخیص و درمان لیشمانیوز:
آندروگرافیل، لاکتون دی ترپنوییدی است که از

- آنالیز سازماندهی ساختاری تک یاخته‌های بیماریزا با روش میکروسکوپ نیروی اتمی

Rocha و de Souza به تشریح موارد استفاده از AFM در انگل شناسی پرداخته‌اند. این محققین در مقاله خود مزایای استفاده از این تکنیک در شناسایی 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 چند تصاویر 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 برهم کنش بابزیا با سلول‌ها در محیط کشت را فراهم می‌سازد 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 برهم کنش فیلامان‌های سطحی و پروتئین متصل شونده به کلسیم (calcium-binding protein) آنتاموباهیس-تولیتیکا (*Entamoeba histolytica*) توسط تکنیک AFM، امکان پذیر می‌باشد (۱۴).

به علاوه شناسایی ساختار ماکرومولکول‌ها با این روش امکان‌پذیر شده است، مثلاً این تکنیک آشکار نموده است که نوکلئید باکتریائی و کروماتین انسانی از فیبرهای مقاوم به درجنت 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

برگ گیاهی به نام *paniculata Andrographis* به دست می‌آید. این ماده فعالیت ضدلشمانیائی کمی دارد و ندرتاً به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده دارای نیمه عمر کوتاه پلاسمائی، دسترسی کوتاه زیستی و توزیع نامناسب بافتی می‌باشد. فرم دادن این ترکیب به صورت نانوذره، تنها گزینه پیش‌رو جهت محلول ساختن آن می‌باشد. بدین منظور این ذرات با $\text{poly(DL-lactide-co-glycolic acid)}$ به نسبت ۵۰-۵۰ ترکیب و به نانوذراتی که قدرت ورود به ماکروفاژهای آلوده شده با آماسیتیگوت‌های 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 173nm و پتانسیل زتا آن‌ها را 34.8mV - تعیین نموده است. توسط AFM، شکل کروی و سطح صاف این نانوذرات قابل رویت شده است. مشخص شده است که این ذرات دارای فعالیت ضد لیشمانیائی با آماده سازی در حضور 4% PVA دارند $\text{IC}_{50} 34 \mu\text{M}$ و این در مقایسه با ترکیب خالص آندروگرافیلد دارای اثرات بیش‌تر و با مقداری در حدود یک چهارم ماده خالص می‌باشد $\text{IC}_{50} 160 \mu\text{M}$. بنابراین نانوذرات آندروگرافیلد، دارای اثر بهتر بوده و می‌تواند در درمان این بیماری انگلی مورد استفاده قرار گیرد (۱۵).

میکروسکوپ الکترونی و AFM/بزراری برای بررسی DNA میتوکندریائی در تک یاخته‌های 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 غیرمعمول‌ترین DNA خارج هسته‌ای است که در طبیعت یافت می‌شود و متشکل از مولکول‌های حلقوی فشرده‌ای می‌باشد که تشکیل شبکه‌ای 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 می‌گردید. 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 رویت ساختن و شناسائی مولکول‌های زیستی استوار است. در این روش، kDNA محلول که حاوی یون‌های منیزیم 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 منیزیم، باز شدن 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 $0.2-0.3\text{nm}$ جمع شده‌اند. بنابراین AFM وسیله‌ای است که توسط آن می‌توان دانش فعلی را در جهت

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 برهم کنش آن‌ها با بخش‌های مختلف دستگاه گوارش پشه خاکی فلوتوموس پاپاتاسی *Phlebotomus papatasi* استفاده شده است. بدین ترتیب، مرفولوژی مراحل مختلف انگل را در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش پشه خاکی تشخیص داده‌اند. تعداد زیادی نکتوموناد (nectomonad) طویل در بخش روده میانی در شکم، هاپتومونادها (haptomonad) متصل شده به کوتیکول دریچه استومادال (stomodaeal)، 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 پرازیکوانتیل، 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 میکروگرم در سی سی از دارو مشاهده گردید. تشکیل واکوئل در نهایت منجر به تخریب لایه سین سیشیال (syncytial) در رأس تگومنت انگل گردید، در حالی که میکروتريش‌های (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 می‌گردد و بدین صورت، مشاهده تغییرات ایجاد شده درون و بیرون انگل به راحتی و با وضوح بسیار، امکان پذیر می‌گردد (۲۸).

مطالعه تاثیر داروهای ضد انگلی آلبندازول (*Albendazole*) و مترونیدازول (*Metronidazole*) بر روی تک یاخته‌های ژiardیا دئودنال (*Giardia duodenalis*)، تریکوموناس واژینالیس (*Trichomonas vaginalis*) و اسپیرونوکلئوس موریس (*Spironucleus muris*) توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

این سه انگل نزدیک به هم، 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 ژiardیا 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 پروتیین‌های 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 می‌گردند (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 صرفه‌جویی در زمان می‌باشد. بعضی از این روش‌ها مانند AFM با

وجود کارآیی بالا، نیاز به تجهیزات خاصی دارد که در همه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی موجود نیست، لذا استفاده از این روش‌ها، محدود خواهد بود و باید از روش‌های در دسترس‌تر استفاده نمود. از آن‌جا که روش AFM، هنوز در حال پیشرفت می‌باشد، چشم‌انداز آینده، طراحی پروب‌های فوق‌العاده نوک تیز و حساس با وضوح بالاتر به منظور شناسایی ساختمان‌های فراساختاری انگل‌ها خواهد بود. فراهم شدن آنالیز سلول‌های زنده نشاندار شده با نشانگرهای فلئورسانت و استفاده از روش میکروسکوپی مرتبط با AFM، می‌تواند اطلاعات با جزئیات از ساختارهای مخصوص را در اختیار محققان قرار دهد. در مجموع روش‌های نوین نانوسکوپی مانند AFM، به دلایل گوناگون و کارآیی‌های متنوع و در اختیار گذاشتن اطلاعات دقیق‌تر و متنوع‌تر، به تدریج به عنوان روش مکمل مناسبی برای نسل‌های قبلی میکروسکوپ الکترونی مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و عبوری (TEM) تبدیل خواهند شد.

هم‌چنین با استفاده از اندازه‌گیری‌های اسپکتروسکوپی متنوع، اطلاعات بیش‌تری از خصوصیات سطحی مانند شارژ، خواص ارتجاعی و برهم‌کنش لیگاند-رستپور در اختیار محققین قرار خواهد داد.

در پایان پیشنهاد می‌شود با توجه به فراهم بودن استفاده از تکنیک نانوسکوپی AFM، در آزمایشگاه‌های جامع کشور ایران از جمله آزمایشگاه جامع دانشگاه علوم پزشکی مازندران، استفاده از این تکنولوژی نوین در زمینه عفونت‌های انگلی به ویژه تک‌یاخته‌های مهم بیماری‌زا مانند گونه‌های مختلف لیشمانیا، پلاسمودیوم‌ها و تری‌پانوزوما، 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 به عمل می‌آید.

References

- Kalinin SV, Groverman A. Scanning probe microscopy, electrical and electromechanical phenomena at the nano scale. New York: Springer; 2007.
- Peng Xi, Hao Xie, Yujia Liu, Yichen Ding. Optical Nanoscopy and Novel Microscopy Techniques. Florida: CRC Press; 2015.
- Rupali Sh, Sayantan M, Lakshmayya Laxmi G. Nanotechnology: The coming revolution in modern biology and medicine. International Research Journal of Pharmacy 2012; 3(5): 109-118.
- Dufrene YF, Pelling AE. Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion. Nanoscale 2013; 5(10): 4094-4014.
- Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan SC, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. Indian J Med Rese 2009; 130(6): 689-701.
- 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.
- Galluzzo CW, Eperon G, Mauris A, Chappuis F. Old World cutaneous leishmaniasis. Rev Med Suisse 2013; 9(385): 990-995.
- 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.
- 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.

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 leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, WHO; 2010.
12. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami Sh, Badiie 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, Vêras 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. 2nded. 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. Kapoor P, Ashutosh A, Naik R, Ganguli M, Siddiqi MI, Sahasrabudhe 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.

27. Cavalcanti 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, Carabineiro S 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.