



Evaluation of the effect of manganese oxide nanoparticles on *Toxoplasma gondii* in vitro

Abstract

Article Info

Introduction: Pyrimethamine and sulfadiazine are selective medications for toxoplasmosis, but some side effects hinder their consumption. Increasing the use of nanoparticles in biological studies and showing the beneficial effects of manganese nanoparticles on fungi and bacteria, as well as the lack of sufficient knowledge on its anti-Toxoplasma impacts, was the motivation for the design of this study. Manganese can provoke cell apoptosis by increasing the activation of the FRXO³a-Bim/PUMA mRNA and caspase-3 pathway. The objective of this study was to investigate the efficacy of manganese oxide nanoparticles (Mn²O³ NPs) against *Toxoplasma gondii* (T. gondii) in vitro.

Methods: To assess the anti-Toxoplasma activity of Mn₂O₃ NPs, the light microscopic observation was applied to evaluate the number of residual parasites in each well. Then, the MTT method was used to specify the toxic effect of Mn²O³ NPs on T. gondii toxicity. Finally, the potential apoptosis of T. gondii by Mn₂O₃ NPs was investigated by flow cytometry assay

Results: The IC₅₀ value of Mn²O³ NPs against T. gondii tachyzoite was 105 µg/ml. There was also no significant toxic effect of Mn²O³ NPs on macrophages due to the high percentage of surviving macrophages at the desired concentration for treatment. The findings of the flow cytometry revealed that about 40% of tachyzoites were caused to apoptosis with Mn²O³ NPs.

Conclusion: Mn²O³ NPs have a beneficial effect on T. gondii tachyzoite in vitro and could be regarded as a candidate for the treatment of this infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Mn₂O₃ NPs, MTT, In vitro

Authors:

Pooya Tavakoli¹

Amir KarimiPour Saryazdi^{1,*}

Ali Dalir Ghaffari^{1,*}

Mohammad Barati²

Yeganeh KarimiPour Saryazdi³

Affiliations

1. Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Infectious Diseases Research Center, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Faculty of medicine, Tehran medical science, Islamic Azad university, Tehran, Iran.

*Corresponding authors:

1. Dr. Ali Dalir Ghaffari, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Tel: +98-9336464141, E-mail: ali.dalirghaffari@yahoo.com
2. Dr. Amir KarimiPourSaryazdi, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Tel: +98-9195539415, E-mail: amirkarimipour49@gmail.com



ارزیابی اثر نانوذره منگنز اکساید بر روی توکسوپلازما گوندی در شرایط برون تنی

چکیده

اطلاعات مقاله

پویا توکلی^۱
امیر کریمی پور سریزدی^{۱*}
علی دلیرغفاری^{۱*}
محمد براتی^۲
یگانه کریمی پور سریزدی^۳

مقدمه: پریمتامین و سولفادایزین داروهای انتخابی برای عفونت توکسوپلازما هستند. با این وجود، برخی عوارض جانبی باعث محدودیت در استفاده از آن‌ها می‌شود. گسترش استفاده از نانوذرات در تحقیقات بیولوژیکی و اثبات اثرات موثر نانوذره منگنز بر قارچ‌ها و باکتری‌ها، در کنار نبود اطلاعات کافی درباره اثر ضد توکسوپلازمایی آن، انگیزه‌ای برای طراحی این مطالعه شده است. منگنز می‌تواند از طریق افزایش فعال‌سازی mRNA ژن FOXO α -Bim/PUMA و فعال‌سازی کاسپاز-۳، آپوپتوز سلول را القا کند. این مطالعه با هدف بررسی اثربخشی نانوذرات منگنز اکساید علیه توکسوپلازما گوندی در شرایط برون تنی انجام شده است.

روش کار: به منظور ارزیابی فعالیت ضد توکسوپلازمایی نانوذرات و تعیین تعداد انگل‌های باقیمانده در هر چاهک از میکروسکوپ نوری استفاده شد. همچنین از آزمون MTT برای تعیین اثر سمیت نانوذره منگنز اکساید بر روی تاکی زوییت توکسوپلازما گوندی استفاده شد. آپوپتوز احتمالی توکسوپلازما گوندی توسط نانوذرات منگنز اکساید با روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: مقدار IC₅₀ نانوذرات منگنز اکساید در مقابل تاکی زوییت‌های توکسوپلازما ۱۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ارزیابی شد. همچنین با توجه به شکل بقا و درصد بالای سلول‌های ماکروفاژ زنده مانده در غلظت مورد نظر برای درمان، اثر سمی قابل توجهی از نانوذره روی ماکروفاژ مشاهده نشد. نتیجه بررسی فلوسایتومتری نیز بیانگر القای حدود ۴۰٪ آپوپتوز در تاکی زوییت‌های توکسوپلازما گوندی است.

نتیجه‌گیری: نانوذرات منگنز اکساید دارای اثری موثر بر روی تاکی زوییت‌های توکسوپلازما گوندی در شرایط برون تنی بوده و می‌تواند به عنوان یک کاندید درمانی برای این آلودگی در نظر گرفته شود.

کلید واژگان: توکسوپلازما گوندی، منگنز اکساید، MTT، برون تنی

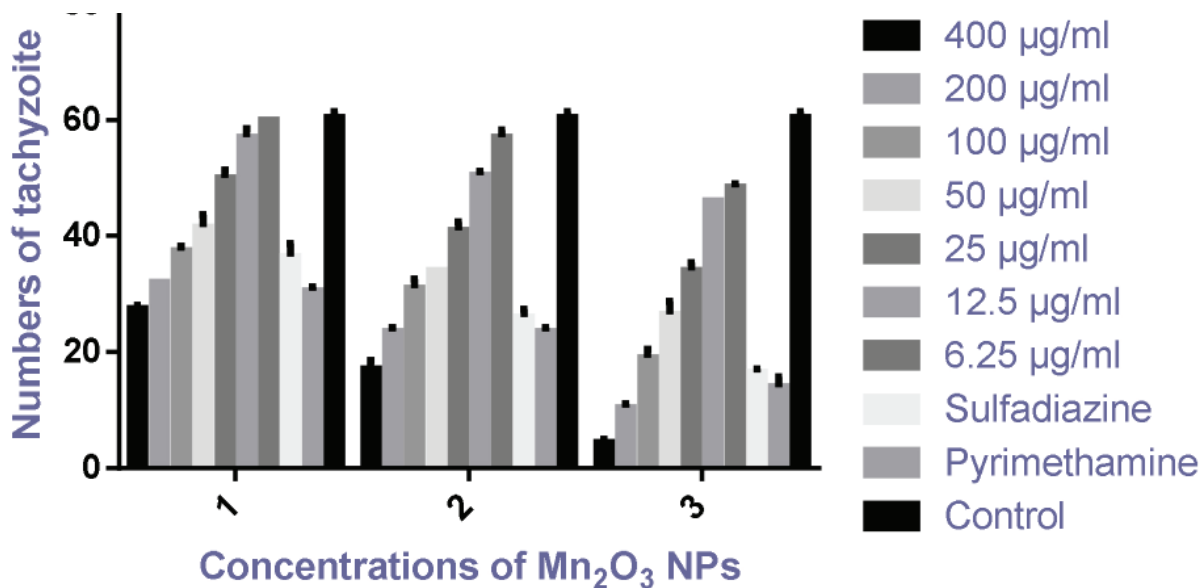
وابستگی سازمانی نویسندگان

۱. گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
 ۳. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- *۱. (نویسنده مسئول): علی دلیرغفاری، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. شماره تماس: ۰۹۳۳۶۴۶۴۱۴۱

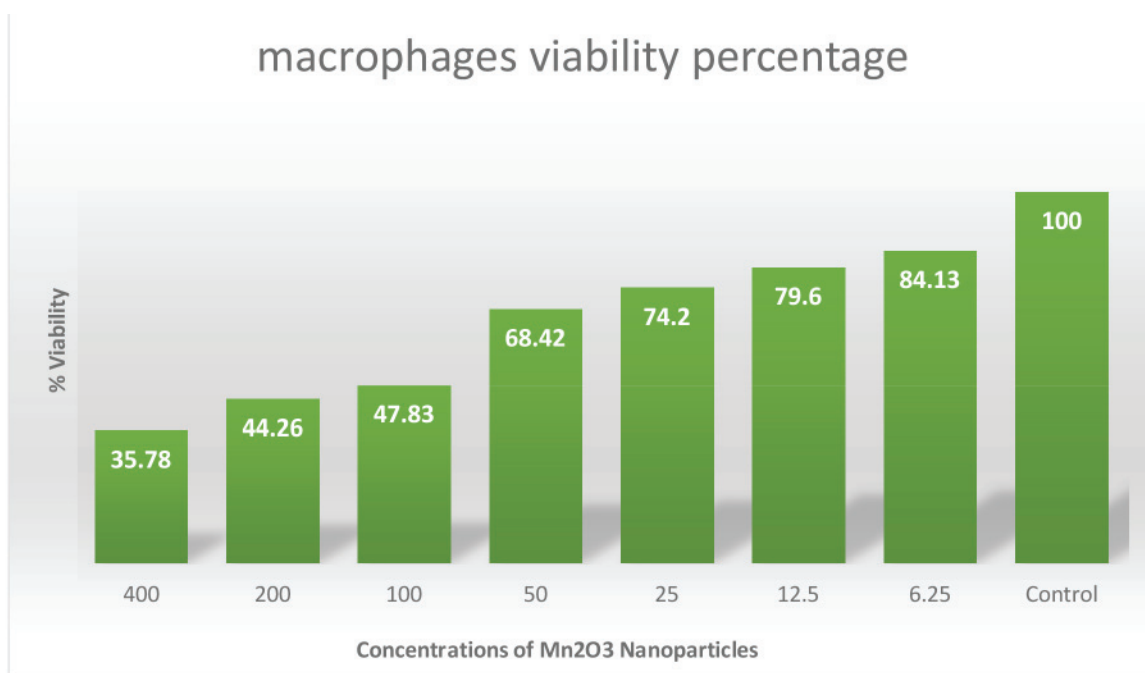
ایمیل: ali.dalirghafari@yahoo.com

۲. (نویسنده مسئول): امیر کریمی پور سریزدی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. شماره تماس: ۰۹۱۹۵۵۳۹۴۱۵

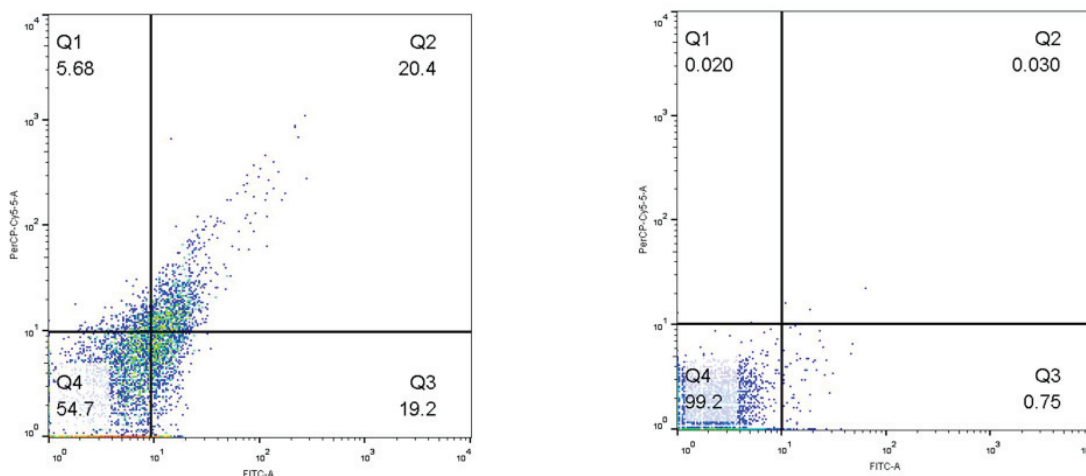
ایمیل: amirkarimipour49@gmail.com



شکل شماره ۱- میانگین و انحراف معیار تعداد تاکی زوییت‌های توکسوپلاسما گوندی درمان شده با نانوذره منگنز اکساید در مقایسه با گروه کنترل.



شکل شماره ۲- درصد بقا تاکی زوییت‌های توکسوپلاسما گوندی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره منگنز اکساید بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون.



شکل شماره ۳- بررسی آپوپتوز و میزان آن در تاکی زوییت‌های توکسوپلازما گوندی بعد از ۲۴ ساعت درمان (سمت راست گروه

کنترل و سمت چپ گروه مواجهه یافته).

نانوذره منگنز اکساید بعد از گذشت ۷۲ h کشت در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. همانطور که از شکل پیداست، با کاهش غلظت از میزان اثر سمی و کشندگی نانوذره منگنز اکساید روی ماکروفاژها کاسته شده و درصد زنده‌مانی افزایش می‌یابد. همچنین در غلظت‌های درمانی مورد نظر میزان سمیت قابل توجهی مشاهده نشد.

فلوسایتومتری

در تحقیق حاضر برای محاسبه میزان سلول‌های نکروز یافته، آپوپتوز یافته و طبیعی از فلوسایتومتری استفاده شد. بدین منظور بعد از گذشت ۲۴ h مجاورت تاکی زوییت با غلظت $\mu\text{g}/\text{mL}$ ۱۰۰ نانوذره منگنز اکساید، درصد سلول‌های طبیعی، نکروتیک و آپوپتوتیک در گروه کنترل به ترتیب ۹۹/۲، ۰/۰۲ و ۰/۷۸ و در گروه مواجهه یافته با نانوذره به ترتیب ۵۴/۷، ۵/۶۸ و ۳۹/۶ می‌باشد (شکل شماره ۳)

بحث و نتیجه‌گیری

شمارش چشمی تاکی زوییت‌های ارزیابی فعالیت ضد انگلی نانوذره منگنز اکساید بعد از ۳، ۶ و ۲۴ h انکوبه کردن، تعداد تاکی زوییت‌های باقی مانده در هر چاهک به کمک میکروسکوپ نوری بررسی شد. با در نظر گرفتن اینکه در ابتدای انکوبه کردن، تعداد تاکی زوییت‌ها 6×10^5 بود، اطلاعات مربوط به هر چاهک در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. مقدار IC_{50} نانوذره منگنز اکساید با توجه به شمارش چشمی طی ۲۴ h، $105 \mu\text{g}/\text{mL}$ محاسبه شد.

ارزیابی MTT ماکروفاژدرصد زنده‌مانی ماکروفاژهای غیر آلوده در غلظت‌های مختلف نانوذره منگنز اکساید بعد از گذشت ۷۲ h

DMSO اضافه شد و میزان جذب نوری هر چاهک با دستگاه الیزابیدر مدل MPR۴ در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و زنده‌مانی سلول‌ها ارزیابی شد.

فلوسایتومتری

جهت بررسی میزان آپوپتوز احتمالی تاکی زوییت‌ها از فلوسایتومتری استفاده شد. برای انجام این تست تعداد 2×10^5 تاکی زوییت در مجاورت نانوذره منگنز اکساید با غلظت $\mu\text{g}/\text{mL}$ ۱۰۰ قرار داده شد. بعد از ۲۴ h انکوبه کردن در دمای 37°C ، طبق دستورالعمل کیت، ابتدا $500 \mu\text{L}$ بافر به آن اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ min روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد پس از اضافه کردن $5 \mu\text{L}$ annexin v و PI، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

شمارش چشمی تاکی زوییت

برای ارزیابی فعالیت ضد انگلی نانوذره منگنز اکساید بعد از ۳، ۶ و ۲۴ h انکوبه کردن، تعداد تاکی زوییت‌های باقی مانده در هر چاهک به کمک میکروسکوپ نوری بررسی شد. با در نظر گرفتن اینکه در ابتدای انکوبه کردن، تعداد تاکی زوییت‌ها 6×10^5 بود، اطلاعات مربوط به هر چاهک در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. مقدار IC_{50} نانوذره منگنز اکساید با توجه به شمارش چشمی طی ۲۴ h، $105 \mu\text{g}/\text{mL}$ محاسبه شد.

ارزیابی MTT ماکروفاژ

درصد زنده‌مانی ماکروفاژهای غیر آلوده در غلظت‌های مختلف

کشت در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. همانطور که از شکل پیداست، با کاهش غلظت از میزان اثر سمی و کشندگی نانوذره منگنز اکساید روی ماکروفاژها کاسته شده و درصد زنده‌مانی افزایش می‌یابد. همچنین در غلظت‌های درمانی مورد نظر میزان سمیت قابل توجهی مشاهده نشد.

فلوسایتومتري در تحقيق حاضر براي محاسبه ميزان سلول‌های نكروز یافته، آپوپتوز یافته و طبیعی از فلوسایتومتري استفاده شد. بدین منظور بعد از گذشت ۲۴ h مجاورت تاکی زوییت با غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ نانوذره منگنز اکساید، درصد سلول‌های طبیعی، نكروتیک و آپوپتوتیک در گروه کنترل به ترتیب ۹۹/۲، ۰/۰۲ و ۰/۷۸ و در گروه مواجهه یافته با نانوذره به ترتیب ۵۴/۷، ۵/۶۸ و ۳۹/۶ می‌باشد (شکل شماره ۳).

امروزه توکسوپلازما به عنوان انگلی شناخته می‌شود که یک سوم جمعیت جهان را درگیر کرده و یکی از معضلات بهداشتی جهان بشمار می‌رود (۲۰). داروهایی از جمله پریمتامین و سولفادiazین برای درمان توکسوپلازموز مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، درمان با این داروها دارای عوارض جانبی مورد توجهی، از جمله ایجاد حساسیت دارویی، سرکوب مغز استخوان و اثرات شدید بر روی جنین می‌باشد. در این مطالعه، اثر ضد توکسوپلازمایی نانوذره منگنز اکساید بر روی تاکی زوییت توکسوپلازما گوندی به کمک روش ارزیابی تاکی زوییت‌های قرار گرفته در مجاورت نانوذره منگنز اکساید بوسیله میکروسکوپ نوری صورت گرفت و IC_{50} به مقدار ۱۰۵ $\mu\text{g/mL}$ حاصل شد، که نشان دهنده اثر ضد انگلی نانوذره و توانایی آن در از بین بردن تاکی زوییت‌ها است. همچنین برای بررسی اثر سمیت احتمالی نانوذره روی سلول‌های ماکروفاژ از تست MTT استفاده شد و با توجه به درصد زنده‌مانی ماکروفاژها در غلظت‌های پایین نانوذره، عدم ایجاد سمیت بر سلول‌های ماکروفاژ مشخص شد.

مطالعه حاضر اولین مطالعه در این زمینه می‌باشد و هیچ مطالعه مشابهی در زمینه استفاده از نانوذرات منگنز اکساید در کنترل توکسوپلازما گوندی انجام نشده است. نتایج نشان می‌دهند که تاکی زوییت‌های توکسوپلازما گوندی نسبت به نانوذرات منگنز اکساید در غلظت‌های مختلف حساس می‌باشند. بر اساس تحقیقات صورت گرفته بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف در گذشته، ویژگی‌های خاصی برای نانوذرات منگنز اکساید در نظر گرفته شده است. در مطالعه‌ای که روی اثرات نانوذرات بر گونه‌های باکتریایی انجام شده، اثرات ضد میکروبی در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلای در مقایسه با استرپتومایسین بررسی شده است (۲۱). در مطالعه دیگری نیز فعالیت ضد قارچی کورکامین تثبیت شده با نانوذره منگنز بر علیه ۴ سوبه قارچی از جمله *Candida*

از سال‌های اخیر نانوذرات در معالجه بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. نتایج در این مطالعه نشان داد که میزان IC_{50} نانوذرات منگنز اکساید در برابر تاکی زوییت‌های توکسوپلازما گوندی ۱۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. نتایج فلوسایتومتري نشان داد که نانوذرات منگنز اکساید باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD) و حدود ۴۰٪ از تاکی زوییت‌های مواجهه یافته با نانوذره دچار آپوپتوز شدند. براساس نتایج به دست آمده، اثر ضد توکسوپلازمایی مطلوبی مشاهده شد و بنابراین، نانوذره منگنز اکساید می‌تواند به عنوان کاندید درمان در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

از سال‌های اخیر نانوذرات در معالجه بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. نتایج در این مطالعه نشان داد که میزان IC_{50} نانوذرات منگنز اکساید در برابر تاکی زوییت‌های توکسوپلازما گوندی ۱۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. نتایج فلوسایتومتري نشان داد که نانوذرات منگنز اکساید باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD) و حدود ۴۰٪ از تاکی زوییت‌های مواجهه یافته با نانوذره دچار آپوپتوز شدند. براساس نتایج به دست آمده، اثر ضد توکسوپلازمایی مطلوبی مشاهده شد و بنابراین، نانوذره منگنز اکساید می‌تواند به عنوان کاندید درمان در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

از سال‌های اخیر نانوذرات در معالجه بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. نتایج در این مطالعه نشان داد که میزان IC_{50} نانوذرات منگنز اکساید در برابر تاکی زوییت‌های توکسوپلازما گوندی ۱۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. نتایج فلوسایتومتري نشان داد که نانوذرات منگنز اکساید باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD) و حدود ۴۰٪ از تاکی زوییت‌های مواجهه یافته با نانوذره دچار آپوپتوز شدند. براساس نتایج به دست آمده، اثر ضد توکسوپلازمایی مطلوبی مشاهده شد و بنابراین، نانوذره منگنز اکساید می‌تواند به عنوان کاندید درمان در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International journal of Nanomedicine*. 2011;6:2705.
- 11- Adeyemi OS, Whiteley CG. Interaction of nanoparticles with arginine kinase from *Trypanosoma brucei*: kinetic and mechanistic evaluation. *International journal of biological macromolecules*. 2013;62:450-6.
- 12- Adeyemi OS, Faniyan TO. Antioxidant status of rats administered silver nanoparticles orally. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2014;9(3):182-6.
- 13- Adeyemi OS, Sulaiman FA. Evaluation of metal nanoparticles for drug delivery systems. *Journal of biomedical research*. 2015;29(2):145.
- 14- MubarakAli D, Thajuddin N, Jeganathan K, Gunasekaran M. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;85(2):360-5.
- 15- Venkataraju JL, Sharath R, Chandraprabha M, Neelufar E, Hazra A, Patra M. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Biochemical Technology*. 2014;3(5):151-4.
- 16- Das S, Bhattacharya A, Debnath N, Datta A, Goswami A. Nanoparticle-induced morphological transition of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: a novel method to treat silkworm grasserie disease. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;97(13):6019-30.
- 17- Rahul S, Chandrashekar P, Hemant B, Bipinchandra S, Mouray E, Grellier P, et al. In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. *Parasitology international*. 2015;64(5):353-6.
- 18- Bhardwaj R, Saudagar P, Dubey VK. Na-
- 1- Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(2):264-96.
- 2- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2008;55(6):467-75.
- 3- Foroutan-Rad M, Khademvatan S, Majidiani H, Aryamand S, Rahim F, Malehi AS. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Iranian pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Acta tropica*. 2016;158:160-9.
- 4- Ghaffari AD, Dalimi A. Molecular Identification of *Toxoplasma gondii* in the Native Slaughtered Cattle of Tehran Province, Iran. *Journal of food quality and hazards control*. 2019.
- 5- Ghaffari AD, Dalimi A, Ghaffarifard F, Pirestani M. Structural prediction and antigenic analysis of ROP16 protein utilizing immunoinformatics methods in order to identification of a vaccine against *Toxoplasma gondii*: An in silico approach. *Microbial Pathogenesis*. 2020;142:104079.
- 6- Kim J-O, Jung S-S, Kim S-Y, Kim TY, Shin D-W, Lee J-H, et al. Inhibition of Lewis lung carcinoma growth by *Toxoplasma gondii* through induction of Th1 immune responses and inhibition of angiogenesis. *Journal of Korean medical science*. 2007;22(Suppl):S38-S46.
- 7- Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *Journal of Controlled Release*. 2008;125(3):210-27.
- 8- Curtis A, Wilkinson C. Nanotechniques and approaches in biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*. 2001;19(3):97-101.
- 9- Debbage P. Targeted drugs and nanomedicine: present and future. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(2):153-72.
- 10- Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova

nobiosciences: a contemporary approach in antiparasitic drugs. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2012;4(3):97-103.

19- Tavakoli P, Ghaffarifar F, Delavari H, Shahpari N. Efficacy of manganese oxide (Mn₂O₃) nanoparticles against *Leishmania major* in vitro and in vivo. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019.

20- Assolini JP, Concato VM, Gonçalves MD, Carloto ACM, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, et al. Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications. *Parasitology research*. 2017;116(6):1603-15.

21- Kamran U, Bhatti HN, Iqbal M, Jamil S, Zahid M. Biogenic synthesis, characterization and investigation of photocatalytic and antimicrobial activity of manganese nanoparticles synthesized from *Cinnamomum verum* bark extract. *Journal of Molecular Structure*. 2019;1179:532-9.

22- Jayandran M, Haneefa MM, Balasubramanian V. Green synthesis and characterization of Manganese nanoparticles using natural plant extracts and its evaluation of antimicrobial activity. *J Appl Pharm Sci*. 2015;5(12):105-10.

23- Zhao X, Liu Y, Zhu G, Liang Y, Liu B, Wu Y, et al. SIRT1 downregulation mediated Manganese-induced neuronal apoptosis through activation of FOXO3a-Bim/PUMA axis. *Science of The Total Environment*. 2019;646:1047-55.

24- Jiang J, Ma X, Wu Q, Qian W, Wang N, Shi S, et al. Upregulation of mitochondrial protease HtrA2/Omi contributes to manganese-induced neuronal apoptosis in rat brain striatum. *Neuroscience*. 2014;268:169-79.

25- Liu X, Yang J, Lu C, Jiang S, Nie X, Han J, et al. Downregulation of Mfn2 participates in manganese-induced neuronal apoptosis in rat striatum and PC12 cells. *Neurochemistry international*. 2017;108:40-51.