DOI: 10.22092/vj.2018.121556.1453
شماره ۱۲۲ بهار ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی اثرات نانوذرات اکسید روی علیه مراحل مختلف زندگی کنه آرگاس پرسیکوس (آکاری: آرگازیده) در شرایط آزمایشگاهی

• **بیژن اسمعیل نژاد (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **آوات سمیعی**
دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **ناصر حاجی پور**
استادیارگروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
• **سپیده رجبی**
دانشجوی دکتری تخصصی انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **یوسف میرزایی**
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سوران، سوران، عراق
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۲-۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۵-۰۲
Email: b.esmaeilnejad@urmia.ac.ir

چکیده

آلودگی با کنه آرگاس در سال‌های اخیر مشکلات عدیده‌ای را برای صنعت طیور در کشور به وجود آورده است. از طرفی پیدایش مقاومت تدریجی به داروهای ضد کنه کنونی، باعث وخامت اوضاع شده است. نانوذرات اکسید روی به عنوان ترکیبات نوظهور و خارق‌العاده در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. یکی از این خواص منحصر به فرد، اثرات ضد میکروبی است. هدف از اجرای مطالعه کنونی بررسی اثرات ضد انگلی نانوذرات روی علیه کنه آرگاس پرسیکوس **می‌باشد. همچنین مقادیر مالوندی آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها و نیتریک اکسید به عنوان شاخص استرس نیتروزاتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. تخم، لارو و کنه بالغ در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی (۱، ۲، ۴ و ۸ قسمت در میلیون) قرار گرفتند و میزان مرگ و مهار تفریخ در فواصل مشخص زمانی ثبت شد. نتایج حاصله حاکی از افزایش مرگ و مهار هچ به شکل وابسته به زمان و غلظت بود. همچنین مقادیر مالوندی آلدهید و نیتریک اکسید به شکل وابسته به غلظت افزایش یافته بود. از یافته‌های مطالعه کنونی می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید روی از طریق القا استرس اکسیداتیو/نیتروزاتیو باعث مرگ کنه و مهار باروری تخم می‌شود.**

کلمات کلیدی: آرگاس پرسیکوس، نانوذره، روی، مالوندی آلدهید، نیتریک اکسید

● Veterinary Researches & Biological Products No 122 pp: 101-109

Assessment of acaricidal effects of zinc oxide nanoparticles against variois life stage of *Argas persicus*, (family: Argasidae) following in vitro exposure

By: Esmaeilnejad, B., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Samiei, A., Ph.D Student of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Hajipour, N., Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Rajabi, S., Ph.D Student of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. and Mirzaei, Y., Department of Biology, Faculty of Sciences, Soran University, Soran, Iraq.

Received: 2018-04-24 **Accepted: 2018-07-24**

Email: b.esmaeilnejad@urmia.ac.ir

Argaspersicus, family Argasidae, is soft tick that has incurred several difficulties to poultry industry. Besides, resistance to available anti-parasitic agents has intensified concerns. In the past few years, Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) as a novel and marvelous material have attracted great interest. One of their outstanding properties is antimicrobial effect. The current research was conducted to assess possible acaricidal impacts of ZnO-NPs on a prevalent tick, A. persicus. Moreover, malondialdehyde (MDA) content as a marker of lipid peroxidation and nitric oxide (NO) level as a marker of nitrosative stress were measured. Egg, larvae and adult ticks were incubated with various concentrations of the nanoparticle (1, 2, 4, 8 ppm). Then, the rate of mortality and hatch inhibition was recorded in constant intervals. The results showed that mortality and hatch inhibition increase in concentration and time dependent manner. MDA and NO level also increased in same pattern. It can be concluded that ZnO-NPs destroy ticks and inhibit egg hatch via induction of oxidative/nitrosative stress.

Keyword: *A. persicus*, Nanoparticle, Zinc, malondialdehyde, nitric oxide

مقدمه

کنه‌ها، انگل های اجباری و خونخوار مهره داران بویژه پستانداران و پرندگان می‌باشند که دارای پراکندگی جهانی هستند و به دلیل آسیب‌های مکانیکی ناشی از گزش مستقیم و مخصوصا به دلیل انتقال پاتوژن‌های مختلف ویروسی، باکتریایی و تک‌یاخته‌ای از لحاظ پزشکی و دامپزشکی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند (۱و۲). کنه‌ها شامل دو خانواده ایکسودیده یا کنه‌های سخت با حدود ۲۴۱ گونه و ۱۱ جنس و کنه‌های آرگازیده یا کنه‌های نرم با ۱۸۳ گونه و ۴ جنس می‌باشند (۳). کنه‌های سخت بر روی تگومنت دارای اسکوتوم سخت و براق از جنس کیتین هستند که سطح پشتی را پوشش می‌دهد، کنه‌های نرم فاقد این اسکوتوم سخت بوده و دارای بدنی چرمی شکل و ناهموار هستند (۴). کنه‌های نرم با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی و بیولوژیکی فراوان از کنه‌های سخت قابل تفکیک هستند. در کنه‌های نرم در مراحل نوچه و بالغ ضمائم دهانی از سطح پشتی قابل رویت نیست و در سطح شکمی قرار دارد، روزنه تنفسی کوچک در طرفین بدن است و در قسمت جلویی کوکسای زوج چهارم پا قرار دارد، درحالی که روزنه تناسلی در وسط در فاصله بین دو زوج اول پاها دیده می‌شود، همچنین در صورت داشتن چشم، آنها در شکافی در بالای پاها قرار می‌گیرند (۵). کنه آرگاس پرسیکوس متعلق به خانواده آرگازیده یک کنه نرم در طیور و پرندگان وحشی بویژه در ماکیان است که اهمیت قابل توجهی در دامپزشکی به دلیل گزش‌های دردناک، خونخواری زیاد از میزبان، ناراحتی و لاغری جوجه‌های مرغ و ماکیان و نیز انتقال بورلیا آنسرینا به ماکیان دارد (۶). این کنه در تمام دنیا و بیشتر در نواحی گرم و خشک یافته شده و همچنین در مناطق مختلف ایران دارای پراکندگی است (۷و۸). نانوذرات مواد نوظهور و خارق‌العاده‌ای هستند که معمولا در پزشکی، صنعت دارو و درمان سرطان‌ها استفاده می‌شوند (۹). در حال حاضر، نانو ذرات برای کاربردهای زیست پزشکی به علت اندازه ذرات در مقیاس نانو و دیگر خواص قابل توجه، از جمله واکنش‌پذیری سطح قابل بهره‌برداری می‌باشند (۱۰). این ذرات می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید کنند که توانایی کشتن عوامل عفونی را دارند (۱۱و۱۲). نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) یکی از پنج ترکیبات روی است که در حال حاضر در فهرست معاونت غذا و داروی ایالات متحده آمریکا به عنوان یک ترکیب بی‌خطر شناخته شده است. ابعاد کوچک نانوذرات به آنها این اجازه را می‌دهد تا از موانع غشایی به راحتی عبور کنند و منجر به واکنش‌های بیشتر گردند (۱۳). اگر چه اثرات ضد

انگلی نانوذرات در چند سال گذشته به خوبی پیش رفته است، اما در مورد مکانیسم‌های ضد انگلی آن اطلاعات کمی موجود است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات ضد انگلی نانوذرات روی علیه مراحل مختلف زندگی کنه نرم آرگاس پرسیکوس در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار

نانوذرات

نانوذرات روی (ابعاد ۲۰-۳۰ نانومتر) با کیفیت بالا و درجه خلوص بالای ۹۹٪ از شرکت تجاری مرتبط تهیه گردید (پیشگامان نانو مواد ایرانیان-مشهد). این نانوذرات در اصل توسط شرکت US) Research Nanomaterials, Inc, USA stock# us۳۵۵۵) سنتز شده بودند. نانوذرات مربوطه به بخش مرکزی خدمات آزمایشگاهی دانشگاه صنعتی شریف (تهران، ایران) برای مطالعه خواص فیزیکی ارسال شدند. الگوهای پراش اشعه ایکس (XRD) مربوط به نانوذرات روی بوسیله‌ی پراش سنج اشعه ایکس X'Pert PRO MPD PANalytical Company با استفاده از تابش مس/کبالت (Å۱/۵۴۰۵۹) با ژنراتور عمل کننده در ۴۵ کیلو ولت و ۴۰ میلی آنگستروم بدست آمد. همچنین، برای ارزیابی مورفولوژی و اندازه نانوذرات روی از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Ziess, Germany ,۹۰۰ EM) استفاده شد. تمام مواد شیمیایی و واکنش دهنده‌های دیگر دارای بالاترین درجه تجاری بودند.

کنه

کنه‌های بالغ آرگاس پرسیکوس از مرغداری‌های سنتی واقع در مناطق مختلف شهرستان ارومیه جمع‌آوری گردید.سپس کنه‌ها در داخل ویال‌های پلاستکی خشک قرار داده شده و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. جهت شناسایی کنه از مراحل بالغ آنها استفاده شد، سپس با استفاده از کلیدهای استاندارد تشخیصی، جنس و گونه آن‌ها با توجه به ویژگی‌های مرفولوژیکی تایید گردید (۱۴). سالم بودن کنه‌های بالغ مورد ارزیابی قرار گرفت بدین ترتیب که کنه‌های صدمه دیده و تغییر رنگ داده حذف شدند، کنه‌های سالم نیز دارای حرکت بودند. در مرحله بعد به منظور کاهش آلودگی‌های قارچی احتمالی بر روی کنه‌های آرگاس، به مدت ۳ ثانیه به شکل عمودی در ظرف حاوی الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند (۱۵). بعد از شناسایی جنس و گونه، برخی از کنه‌های ماده خون خورده آرگاس پرسیکوس در داخل لوله‌های شیشه‌ای حاوی کاغذ صافی مرطوب شده با آب مقطر استریل قرار داده شدند و درب آنها با استفاده از مقداری پنبه بسته نگاه داشته شد. سپس لوله‌ها داخل یک دسیکاتور در دمای اتاق (۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) با رطوبت نسبی ۸۰٪ قرار داده شدند. در این مدت کنه‌های ماده خون‌خواری کرده تخم‌ریزی نمودند. بعد از تخم‌گذاری، تعدادی از تخم‌ها به لوله‌های شیشه‌ای جدید تا زمان خروج نوزادان منتقل شدند. تعدادی دیگر از تخم‌ها نیز جهت آزمایش مهار تفریخ مورده استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی سوسپانسیون نانوذرات روی

سوسپانسیون نانوذرات و غلظت‌های مختلف آن بر اساس دستورالعمل توصیف شده قبلی آماده گردید (۱۶). به طور مختصر، سوسپانسیون استوک نانوذرات روی در فسفات بافر سالین (PBS) با pH =۷/۴ بوسیله تعلیق ۱۰ میلی‌گرم اکسید روی به ازای هر ۱ میلی‌لیتر محلول بدست آمد. به منظور بدست آوردن محلول یکنواخت و شکستن توده‌های موجود، محلول بصورت متناوب با استفاده از پروب سونیکاتور(Branson Sonifier, USA) به مدت ۱۰ دقیقه در ولتاژ ۳۰ ولت سونیکه گردید. سپس غلظت‌های نهایی نانوذرات ۱و ۲و ۴ و ۸ قسمت در میلیون با رقیق کردن محلول استوک تهیه گردید.

تیمار کردن کنه‌های بالغ و نوزاد با نانوذرات روی

برای هر غلظت تحت تیمار (۱و ۲و ۴ و ۸ قسمت در میلیون) سه گروه تکرار همزمان از هر کنه مورد آزمایش در غالب گروه‌های ۲۰ تایی در نظر گرفته شد. همچنین ۶۰ عدد کنه در سه گروه ۲۰ تایی به عنوان گروه کنترل منفی تحت تیمار با آب مقطر استریل جای گرفتند که در مجموع ۳۰۰ عدد کنه آرگاس پرسیکوس بالغ مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت‌های مختلف نانوذره روی با استفاده از یک پیپت در سطح داخل کاغذ واتمن نمره ۱ ریخته شده و سپس محلول مذکور به طور یکنواخت پخش گردید. آنگاه لبه‌های کاغذ واتمن به اندازه ۱۰ میلی متر به طرف داخل تا شده و با استفاده از گیره فلزی به خوبی محکم گردید. در سطح خارجی کاغذ، مشخصات هر گروه یاد داشت شده و سپس کنه‌ها در داخل پاکت‌های تهیه شده قرار گرفتند. در مرحله آخر، پاکت‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰ تا ۹۰ ٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در فواصل منظم ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت کنه‌ها از لحاظ زنده‌مانی مورد بررسی قرار گرفتند. مبنای زنده نبودن کنه‌ها، مشاهده عدم تحریک آن‌ها بعد از تحریک در زیر لوپ آزمایشگاهی بود (۱۷). تیمارها و غلظت‌های مورد اشاره بر روی کنه‌های نوزاد نیز انجام شد. با این تفاوت که ظروف حاوی نوزادان کنه، قبل از آغاز تیمار به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا مقداری از تحرک آنها کاسته شود.

ارزیابی مهار هچ تخم

به منظور ارزیابی اثرات غلظت‌های مختلف نانوذرات روی بر علیه میزان هچ شدن تخم‌ها، بدون در نظر گرفتن سن به طور تصادفی انتخاب شده و تعداد ۵۰ عدد بر روی کاغذ واتمن شماره ۱ قرار گرفتند. در مرحله بعدی کاغذهای حاوی تخم به مدت ۲ ثانیه در ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر غلظت نانوذره غوطه‌ور شدند. گروه کنترل نیز در داخل ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل قرار گرفت. بعد از خشک شدن تخم‌ها بر روی کاغذ، به داخل سرنگ‌های پلاستیکی منتقل شدند و در انکوباتور نگهداری گردیدند. میزان تفریخ تخم در فواصل زمانی ۶، ۹ و ۱۲ روز مورد ارزیابی قرار گرفته و تعداد لاروهای به دست آمده در هر گروه ثبت شد.

ارزیابی پروکسیداسیون لیپید و استرس نیتروزاتیو

پس از ۲۴ ساعت مجاورت با غلظت‌ها مخلف نانوذره روی، ۳ عدد کنه از هر ظرف به طور تصادفی انتخاب گردیدو پس از شستشو با آب مقطر، عصاره همگن با استفاده از دستگاه هموژن‌کننده خودکار تهیه شد (۱۶). از این عصاره همگن برای ارزیابی پراکسیداسیون چربی و مقادیر نیتریک اکسید استفاده شد.

مقدار مالوندی آلدهید به عنوان یک نشانگر زیستی جهت شناسایی مقدار پروکسیداسیون لیپید بر اساس دستورالعمل توصیف شده توسط بوژ و آئوست (۱۸) با تغییراتی جزئی اندازه‌گیری شد. یک حجم از ماده هموژن شده با دو حجم از یک محلول استوک ۱۵ درصد وزنی- حجمی تری کلرو استیک اسید، ۰/۳۷۵ درصد وزنی- حجمی تیوباربیتوریک اسید و ۰/۲۵ مول بر لیتر هیدروکلریک اسید کاملا مخلوط شد. بعد از طی چرخه گرم کردن و خنک کردن، محلول بوسیله سانتریفوژ کردن در دور ۱۰۰۰ rpm برای مدت ۱۰ دقیقه شفاف گردید. میزان جذب محلول شفاف شده در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد و مقدار مالوندی آلدهید با استفاده از ضریب ثابت $1/56 \times 10^{5}$ mcl^{-1} cm^{-1}محاسبه گردید. سطح مالوندی آلدهید تحت عنوان نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. مقدار کل نیترات/نیتریت نمونه‌های انگل برطبق روش روتین واکنش گریس (Griess Reatction) اندازه‌گیری شد (۱۹). برای این کار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع فوقانی با ۱۰۰ میکرولیتر از معرف گریس در پلیت های ۹۶ خانه‌ای مخلوط گردید و سپس واکنش بعد از ۱۰ دقیقه در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۲۰). مقدار نیتریت اکساید انگل تحت عنوان نانومول بر میلی گرم پروتئین بیان گردید.

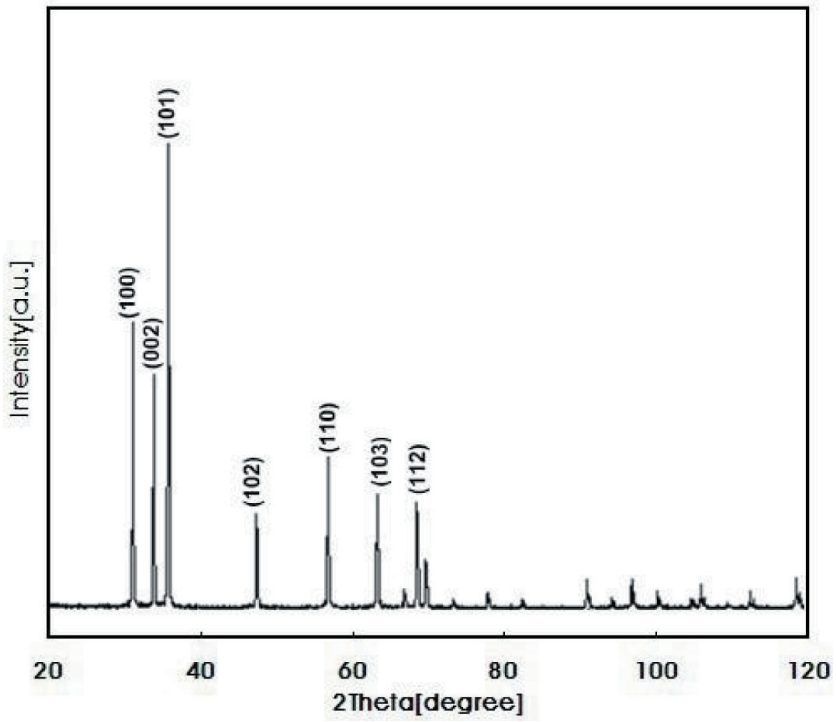
آنالیز آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) آنالیز شدند. تمامی پارامترهای مورد مطالعه بین گروه‌های کنترل و تیمار با استفاده از ANOVA یکطرفه مقایسه شدند. داده‌های پردازش شده به شکل میانگین± انحراف معیار نمایش داده شد. همچنین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد ($p < ۰/۰۵$) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

ارزیابی نانوذرات اکسید روی

تکنیک پراش اشعه X و تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره دو روشی هستند که به طور گسترده جهت مطالعه ارزیابی خواص فیزیکی نانوذرات استفاده می‌شوند. الگوی پراش اشعه X مربوز به نانوذرات استفاده شده طی مطالعه کنونی در شکل ۱ آورده شده است. همانطور که داده‌های کارت JCDPS (No., 36-1451, a= 0.3249 nm, c= 0.5206 nm) نشان می‌دهد، پیک‌های پراش با فاز هشت وجهی نانوذرات اکسید روی تطابق دارد. ماهیت تیز پیک‌ها حاکی از کریستاله بودن زیاد نانوذرات است. با استفاده از رابطه شرر، اندازه کریستالیت‌ها ۲۱۲ انگستروم محاسبه گردید. تصویر مکروسکوپ الکترونی گذاره توزیع یک دست نانوذرات و ساختار کروی آن‌ها را مشخص ساخت. تصویر ارائه شده (شکل ۲) حاکی از ماهیت کروی بوده و اندازه قطر نانوذرات در محدوده ۲۰-۳۰ نانومتر است.



شکل ۱- الگوی پراش اشعه ایکس مربوط به نانرذرات اکسید روی

اثرات نانوذرات اکسید روی علیه لارو و کنه بالغ

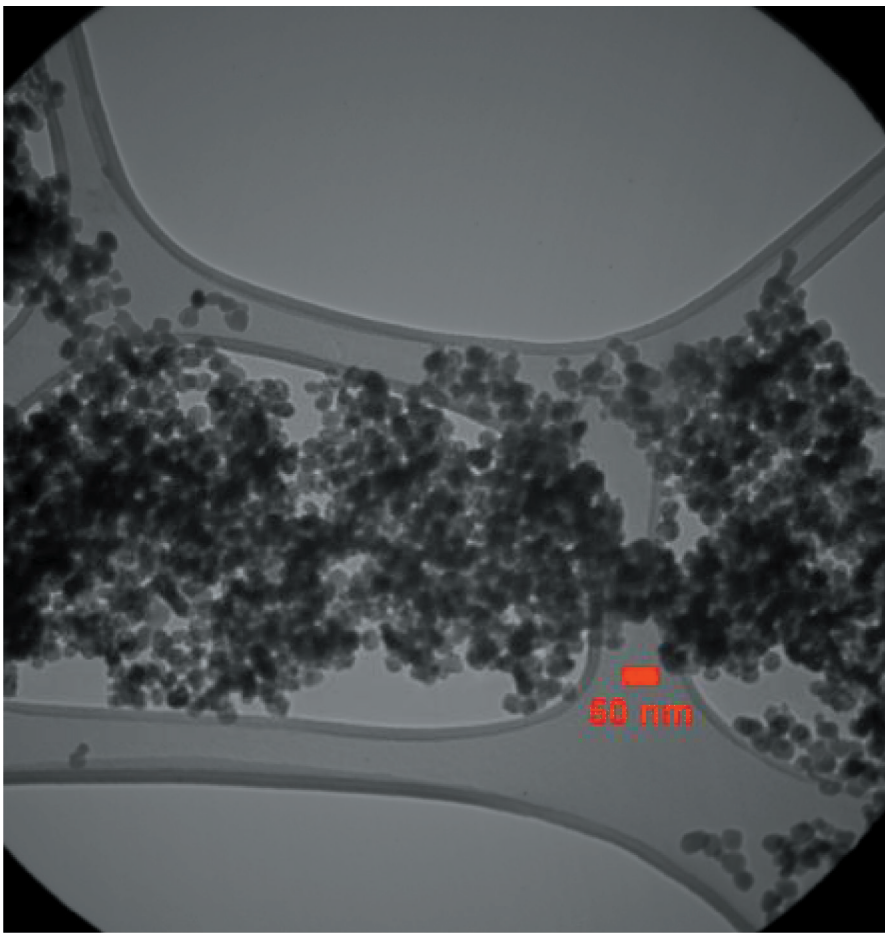
نتایج حاصل از مجاورت لارو و کنه بالغ با نانوذرات اکسید روی حاکی از اثرات وابسته به غلظت و زمان این نانوذره است. همانطوری که در جدول ۱ نشان داده شده است، به دنبال تماس لارو کنه با نانوذرات اکسید روی تعداد لاروهای مرده در گذر زمان و به شکل وابسته به غلظت رو به افزایش گذاشته است. به طوری که غلظت‌های ۴ و ۸ قسمت در میلیون از نانوذره طی ۲۴ ساعت باعث نابودی تمامی لاروها شده‌اند. همچنین، نانوذرات با الگوی مشابهی باعث مرگ و میر کنه‌های بالغ شده است. همانطور که از جدول ۲ مشخص است، با گذر زمان و افزایش غلظت، تعداد کنه‌های مرده نیاز افزایش یافته اند. این در حالی است که دز کمینه نانوذره (۱قسمت در میلیون) پس از گذشت ۲۴ ساعت توانسته است فقط ۵ کنه را نابود کند. همچنین، در مقایسه با نتایج حاصل از مجاورت لارو، غلظت ۴ قسمت در میلیون نانوذره باعث نابودی تمام کنه‌های بالغ نشده است.

درصد مهار تفریخ

به دنبال مجاورت تخم‌ها با نانوذرات اکسید روی، میزان مهار هچ در فواصل زمانی مشخص ثبت شده و نتایج حاصله در جدول ۳ به تصویر کشیده شده است. همانطور که می‌توان مشاهده کرد، در گروه شاهد درصد مهار پس از ۱۲ روز فقط ۷/۳۴ ٪ بوده است. این درحالی که در گروه تیمار با غلظت ۸ قسمت در میلیون، میزان مهار تا ۹۸ درصد بوده است. از طرفی غلظت کمینه نانوذره نیز موفق به مهار هچ تا نزدیک به ۵۰ درصد پس از ۱۲ روز شده است.

مقادیر مالوندی آلدهید و نیتریک اکسید

مقادیر مالوندی آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها و نیتریک



شکل۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره مربوط به نانوذرات اکسید روی (scale bar= ۵۰ nm)

اکسید به عنوان شاخص استرس نیتروزاتیو در هردو مرحله لارو و بالغ به دنبال مجاورت ۲۴ ساعته با نانوذرات اکسید روی اندازه‌گیری شده و نتایج آن در جدول ۴ درج شده است. همانطور که قابل مشاهده است، هر دو شاخص فوق‌الذکر به شکل وابسته به غلظت در هردو مرحله زندگی کنه رو به افزایش گذاشته‌اند. به طوری که در مقایسه با گروه شاهد، مقادیر مالوندی آلدهید و نیتریک اکسید در کنه بالغ تحت تیمار با غلظت ۸ قسمت در میلیون به ترتیب حدودا ۶ و ۲ برابر افزایش یافته است. این مقادیر برای مرحله لارو به ترتیب، حدود ۵ و ۳ برابر بوده است.

بحث

در سال‌های اخیر، مقاومت در برابر عوامل ضدانگلی موجود، باعث نگرانی‌های عمومی بسیاری در این زمینه شده است. انتظار می‌رود کنترل بعضی از انگل‌های داخلی و خارجی با استفاده از داروهای معمول ضد انگلی در آینده نزدیک امکان‌پذیر نباشد. علاوه بر این، مشکل باقی‌مانده داروها نگرانی‌های موجود را تشدید کرده است. بنابراین، جستجو برای ضد انگل‌های جدید و بالقوه یک سیاست مبرم و ضروری می‌باشد. از این رو، نانوذرات به عنوان مواد نوظهور علاقه‌های زیادی را برای کنترل و درمان عفونت‌های انگلی به ارمغان آورده‌اند. به تازگی، تعدادی مقالات پژوهشی در مورد اثرات ضدکنه‌ای نانوذرات فلزی منتشر شده است (۱۶و۲۱و۲۲و۲۳). اما فقط بخش کوچکی از مطالعات انجام شده در زمینه مکانیسم‌های احتمالی اثرات ضدانگلی به کار گرفته شده است. با توجه به کمبودهای موجود، مطالعه کنونی با هدف بررسی اثرات نانوذرات اکسید روی علیه کنه نرم آرگاس پرسیکوس طراحی و اجرا گردید.

یافته‌های مطالعه کنونی به خوبی نشان داد که اثرات تانوذره اکسید روی وابسته به زمان و غلظت است. به طوری که با افزایش این دو عامل، میزان مرگ و میر نیز افزایش می‌یابد. در همین راستا، Banumathi و همکاران در سال ۲۰۱۶ به مطالعه اثرات نانوذرات اکسید روی سنتز شده با منشا گیاهی علیه کنه ریپیسفالوس میکروپولوس پرداختند (۱۶) و نتایج هم‌راستا با مطالعه کنونی را به دست آوردند.

از مقایسه جدول‌های ۱ و ۲ با یکدیگر می‌توان پی برد که نانوذره به میزان بیشتری باعث تخریب و مرگ لاروها در مقایسه با کنه بالغ می‌شود. یک توضیح احتمالی برای این یافته می‌تواند حساسیت فیزیکی بیشتر لاروها و محتوای آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کمتر در مقایسه با فرم بالغ باشد. نانوذرات به دلیل ابعاد بسیار کوچک به راحتی از غشاهای ریستی عبور کرده و در داخل بافت‌ها و سلول‌ها انباشته می‌شوند. این مواد توانایی تولید رادیکال‌های سمی آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن در مقادیر بالا را دارند. در صورتی که سپر آنتی‌اکسیدانی بدن نتواند علیه استرس اکسیداتیو القاءشده ایستادگی کند، مرگ و نابودی سلولی و بافتی رخ خواهد داد.

به دنبال مجاورت تخم کنه با نانوذرات اکسید روی، میزان باروری تخم‌ها تاحدود زیادی افول نمود. این اثرات نیز وابسته به غلظت و زمان بود. در این راستا Araj و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۲۴)، تخم نوعی آفت گیاهی را با نوذرات نقره مجاور کرده و نتایج مشابه با مطالعه کنونی را گزارش نمودند.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید یک نشانگر طلایی در ارتباط با آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن است و ارزیابی مالوندی آلدهید یک روش قابل اعتماد برای به دست آوردن چنین تصمیم‌گیری است (۲۵). طی مطالعه کنونی مقادیر مالوندی آلدهید در هر دو مرحله لارو و بالغ کنه آرگاس اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل حاکی از افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها به شکل وابسته به غلظت بود. می‌توان چنین نتیجه گرفته که با افزایش غلظت میزان القا استرس اکسیداتیو نیز افزایش می‌یابد. در همین راستا، درستکار و همکاران در سال ۲۰۱۷ (۲۶) نشان دادند که به دنبال مجاورت انگل توکسوکارا ویتولورم با نانوذرات اکسید روی و اکسید آهن مقادیر مالوندی آلدهید به شکل وابسته به غلظت افزایش می‌یابد. نانوذرات پس از ورود به داخل بدن، باعث تولید رادیکال‌های سمی می‌شوند که این مولکول‌های مضر به مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک هجوم برده و باعث تخریب آن‌ها می‌شوند. گزارش شده است که به دنبال تخریب غشاء سلول توسط مولکول‌های اکسیدان، مقادیر مالوندی آلدهید افزایش می‌یابد.

نیتریک اکساید می‌تواند با چندین مولکول اکسیداتیو نظیر اکسیژن مولکولی، گونه‌های فعال اکسیژن، فلزات فعال و تیول‌ها واکنش نشان دهد تا گونه‌های مختلف نیتروژن فعال تولید کند و بنابراین، استرس نیتروزاتیو را القا کند. گونه‌های فعال نیتروژن، همچون گونه‌های فعال اکسیژن خطرناک بوده و به انواع مولکول‌ها و ساختارهای زیستی حمله کرده و باعث تخریب و نابودی آنها می‌شوند. نتایج مطالعه کنونی نشان داد که مقادیر نیتریک اکسید به دنبال تماس با نانوذرات اکسید روی به شکل وابسته به غلظت افزایش می‌یابد. این یافته با مشاهدات درستکار و همکاران (۲۶) که طی آن توکسوکارا ویتولورم با نانوذرات اکسید روی مجاور شده بود، کاملا تطابق دارد.

خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات کاملا وابسته به ابعاد آنها است. به طوری که با کاهش اندازه واکنش پذیری آن‌ها به شدت افزایش می‌یابد. طی مطالعه کنونی از نانوذرات با ابعاد ۲۰ تا ۳۰ نانومتر استفاده گردید. این احتمال وجود دارد که در صورت استفاده از نانوذرات با ابعاد کوچکتر، میزان مرگ و میر کنه نیز بیشتر خواهد بود.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته، نتایج مطالعه کنونی به خوبی نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید روی باعث مرگ و میر چشمگیر مرحله لارو و بالغ کنه آرگاس پرسیکوس به شکل وابسته به غلظت و زمان می‌شود. همچنین باروری تخم‌ها نیز به همین ترتیب کاهش یافته است. همانطور که نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقادیر مالوندی آلدهید و نیتریک اکسید نشان می‌دهند، نانوذرات اکسید روی از طریق القا استرس اکسیداتیو/نیتروزاتیو باعث مرگ و نابودی کنه می‌گردد. مطالعات بیشتری لازم است تا غلظت دقیق و بهینه نانوذره با بیشترین کارایی و کمترین عوارض نا مطلوب مشخص شود. همچنین، ابعاد بیشتری از استرس اکسیداتیو مانند فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی باید در کنه مذکور مورد مطالعه قرار بگیرد. چنین ملاک‌هایی می‌تواند در مطالعات آتی مد نظر قرار گرفته شوند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله از آقای دکتر علی نظری‌زاده بخاطر مشاوره‌های

مفید و کمک‌های مثمر ثمر ایشان در نوشتن این مقاله تشکر وقدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Kaufman, W.R. 2010. Ticks: physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 1: 11-22.

2. Tavassoli, M., S.H. Pourseyed, A. Ownagh, I. Bernousi and K. Mardani. 2011. Biocontrol of pigeon tick Argas reflexus (Acari: Argasidae) by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 1445-1452.

3. Molyneux, D.H. 1993. Vectors. In: Francis EG Cox (2nd edn), Modern parasitology: a textbook of parasitology. Wiley-Blackwell, USA p.53-74.

4. Sarwar, M. 2017. Status of Argasid (Soft) Ticks (Acari: Parasitiformes: Argasidae) In Relation To Transmission of Human Pathogens. *International Journal of Vaccines & Vaccination* 4(4): 00089.

5. Guglielmone, A.A., R.G. Robbins, D.A. Apanaskevich, T.N. Petney, A. Estrada-Peña, I.G. Horak, R. Shao and S.C. Barker. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528: 1-28.

6. Pantaleoni, R., M. Baratti, L. Barraco, C. Contini, C. Cossu, M. Filippelli, L. Loru and M. Romano. 2010. *Argas (Persicargas) persicus* (Oken, 1818) (Ixodida: Argasidae) in Sicily with considerations about its Italian and West-Mediterranean distribution. *Parasite* 17: 349-355.

7. Abbassian-lintzen, R. 1960. A Preliminary List of Ticks (Acariña: Ixodoidea) occurring in Iran and their Distributional Data. *Acarologia* 2: 43-61.

8. Lak, S.S., H. Vatandoost, Z. Telmadarraiy, R.E. Mahdi and E. Kia. 2008. Seasonal activity of ticks and their importance in tick-borne infectious diseases in West Azerbaijan, Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* 2: 28-34.

9. Nair, S., A. Sasidharan, V.D. Rani, D. Menon, S. Nair, K. Manzoor and S. Raina. 2009. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. Journal of Materials Science: *Materials in Medicine* 20: 235.

10. Adeyemi, O.S. and C.G. Whiteley. 2013. Interaction of nanoparticles with arginine kinase from *Trypanosoma brucei*: kinetic and mechanistic evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 450-456.

11. Bhardwaj, R., P. Saudagar and V.K. Dubey. 2012. Nanobiosciences: a contemporary approach in antiparasitic drugs. *Molecular and Cellular Pharmacology* 4: 97-103.

12. Butkus, M.A., M.P. Labare, J.A. Starke, K. Moon and M. Talbot. 2004. Use of aqueous silver to enhance inactivation of coliphage MS-2 by UV disinfection. Applied and Environmental Microbiology 70: 2848-2853.

13. Adeyemi, O.S. and T.O. Faniyan. 2014. Antioxidant status of rats administered silver nanoparticles orally. Journal of Taibah University Medical Sciences 9: 182-186.

14. Wall, R and D. Sheare, 1997. Veterinary Entomology. Chapman & Hall, London,pp. 96-149

15. Pourseyed, S., M. Tavassoli, I. Bernousi and K. Mardani. 2010. Metarhizium anisopliae (Ascomycota: Hypocreales): an effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick Argas persicus (Acari: Argasidae). Veterinary Parasitology 172: 305-310.

16. Banumathi, B., B. Malaikozhundan and B. Vaseeharan. 2016. Invitro acaricidal activity of ethnoveterinary plants and green synthesis of zinc oxide nanoparticles against Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Veterinary Parasitology 216: 93-100.

17. Marangi, M., M.A. Cafiero, G. Capelli, A. Camarda, O.A.E. Sparagano and A. Giangaspero. 2008. Evaluation of the poultry Arthropod parasites susceptibility to some acaricides in a weld population from Italy. Journal of Arthropod-Borne Diseases 8: 520-525.

18. Buege, J.A. and S.D. Aust. Section. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology Elsevier; 52: 302-310.

19. Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok and S.R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry 126: 131-138.

20. Ding, A.H., C.F. Nathan and D.J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. The Journal of Immunology 141: 2407-2412.

21. Jayaseelan, C., A.A. Rahuman, G. Rajakumar, A.V. Kirthi, T. Santhoshkumar, S. Marimuthu, A. Bagavan, C. Kamaraj, A.A. Zahir and G. Elango. 2011. Synthesis of pediculocidal and larvicidal silver nanoparticles by leaf extract from heartleaf moonseed plant, Tinospora cordifolia Miers. Parasitology Research 109: 185-194.

22. Benelli, G., F. Maggi, D. Romano, C. Stefanini, B. Vaseeharan, S. Kumar, A. Higuchi, A.A. Alarfaj, H. Mehlhorn and A. Canale. 2017. Nanoparticles as effective acaricides against ticks—a review. Ticks and Tick-Borne Diseases 8: 821-826.

23. Avinash, B., R. Venu, K.S. Rao, C. Srilatha and T. Prasad. 2017. In vitro evaluation of acaricidal activity of novel green silver nanoparticles against deltamethrin resistance Rhipicephalus (Booph-

ilus) microplus. Veterinary Parasitology 237: 130-136.
24. Araj, S.-E.A., N.M. Salem, I.H. Ghabeish and A.M. Awwad. 2015. Toxicity of nanoparticles against *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Nanomaterials* 2015: 5.
25. Nazarizadeh A. and S. Asri-Rezaie. 2016. Comparative study of antidiabetic activity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in diabetic rats. *AAPS PharmSciTech* 17,834-843.
26. Dorostkar, R., M. Ghalavand, A. Nazarizadeh, M. Tat and M.S. Hashemzadeh. 2017. Anthelmintic effects of zinc oxide and iron oxide nanoparticles against *Toxocara vitulorum*. *International Nano Letters* 7: 157-164.

جدول۱- میانگین تعداد لارو های مرده آرگاس پرسیکوس **به دنبال مجاورت با نانوذرات اکسید روی در سه تکرار**

	6h	12 h	24 h
کنترل	0	0	0
ppm	8.3% (1.66±0.57$^{a|}$)	28.3% (5.66±0.57^{a†})	68.3% (13.66±1.53^{a‡})
ppm	16.65% (3.33±0.57$^{b|}$)	41.65% (8.33±0.57^{b†})	83.3% (16.66±1.15^{b‡})
ppm	31.65% (6.33±0.57$^{c|}$)	56.65% (11.33±0.57^{c†})	98.3% (19.66±0.57^{c‡})
ppm	51% (10.33±0.57$^{d|}$)	71.65% (14.33±1.15^{d†})	100% (20^{c‡})

حروف انگلیسی د ر هر ستون (a-d) نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) می باشد.
اشکال (| -‡) در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) می باشد.

جدول۲- میانگین تعداد کنه های بالغ مرده آرگاس پرسیکوس **به دنبال مجاورت با نانوذرات اکسید روی در سه تکرار**

	6h	12 h	24 h
کنترل	0^{a}	0^{a}	0^{a}
1 ppm	8.3% (1.66±0.57$^{b|}$)	11.65% (2.33±1.15$^{b|}$)	23.35% (4.67±0.57^{b†})
2 ppm	11.65% (2.33±0.57$^{c|}$)	26.65% (5.33±0.57^{c†})	51.65% (10.33±1.53^{c‡})
4 ppm	18.35% (3.67±0.57$^{d|}$)	43.35% (8.67±0.57^{d†})	73.35% (14.67±0.57^{d‡})
8 ppm	35% (7$^{e|}$)	78.3% (15.66±1.15^{e†})	100% (20^{e‡})

حروف انگلیسی د ر هر ستون (a-d) نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) می باشد.
اشکال (| -‡) در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) می باشد.

جدول۳- درصد مهار تفریخ در فواصل زمانی مشخص به دنبال مجاورت تخم های آرگاس پرسیکوس با نانوذرات اکسید روی در سه تکرار

	6 day	9 day	12 day
کنترل	78.66±1.14[a]|	47.32±1.14[a]†	7.34±1.14[a]‡
1 ppm	80.66±1.14[b]|	57.32±3.06[b]†	48.66±1.14[b]‡
2 ppm	85.32±1.14[c]|	71.32±1.14[c]†	65.32±1.14[c]‡
4 ppm	89.32±2.30[d]|	76.00±2.00[d]†	70.66±1.14[d]‡
8 ppm	93.32±1.14[e]|	96.66±1.14[e]†	98[e]‡

حروف انگلیسی د ر هر ستون (a-d) نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) می باشد.
اشکال (| -‡) در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) می باشد.

جدول۴- مقادیر مالوندی آلدهید (MDA) و نیتریک اکسید (NO) در هردو مرحله لارو و بالغ به دنبال مجاورت ۲۴ ساعته با نانوذرات اکسید روی برحسب نانومول بر میلی گرم پروتئین در سه تکرار

	بالغ		نوزاد	
	NO	MDA	NO	MDA
کنترل	7.3± 0.12[a]	0.37±0.06[a]	3.13±0.06[a]	0.57±0.06[a]
1 ppm	8.13±.0.11[b]	0.45±0.01[a]	3.9±0.1[b]	0.83±0.06[b]
2 ppm	9.6±0.1[c]	0.69±0.01[b]	5.37±0.06[c]	1.4±0.05[c]
4 ppm	11.23±0.11[d]	1.23±0.06[c]	7.43±0.06[d]	1.57±0.05[d]
8 ppm	14.73±0.06[e]	1.93±0.06[d]	10.23±0.06[e]	2.23±0.06[e]

حروف انگلیسی در هر ستون (a-e) نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح (p < ۰/۰۵) می باشد.