

تأثير ثنائي أكسيد التيتانيوم TiO_2 NPs النانوي على الأميبا اللثوية *Entamoeba gingivalis* خارج الجسم الحي

غادة عبدالرحمن طاقة	نجاح صبحي نايف	خنساء عزيز يونس
قسم علوم طب الاسنان الاساسية/ كلية طب الأسنان/ جامعة الموصل Ghada.abd.taqa@gmail.com	قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الموصل Najahsobhi@gmail.com	قسم علوم طب الاسنان الاساسية/كلية طب الاسنان/ جامعة الموصل Khansaaazeez98@gmail.com

(أستلم 2019/ 3 /11 ؛ قُبل 2019/ 6 /18)

الملخص

تمت دراسة تأثير الجزيئات النانوية لثنائي أكسيد التيتانيوم النانوي (TiO_2NP_s) على طفيلي *Entamoeba gingivalis* خارج الجسم الحي المعزول من اللثة في مرضى التهاب اللثة الذين يرتادون قسم أمراض اللثة في كلية طب الاسنان لجامعة الموصل للفترة من 2018/4/1 إلى 2018/7/31.

حضرت 3 تراكيز من TiO_2NP_s وهذه التراكيز هي (0.001، 0.1، 0.01) ملغم/مل. تم تقييم تأثير التراكيز المختلفة بعد 2، 4 و 6 ساعات وقد أظهرت النتائج أن ازدياد التركيز وعامل الوقت له تأثير ايجابي على قتل الطفيلي فكان التركيز الأعلى 0.1 ملغم/مل من TiO_2NP_s له دور في تثبيط نمو الطفيلي وخفض معدل البقاء للطفيلي والذي بلغ 3.60 ± 0.953 ، وان النسبة المئوية للقتل في هذا التركيز كانت هي الأعلى 86.37% وفي الفترة الزمنية 6 ساعة مقارنة مع التراكيز الأخرى والفترة الزمنية 2، 4 ساعة والتي أظهرت فروقات معنوية بسيطة فيما بينها.

الكلمات الدالة: الأميبا اللثوية، ثنائي أكسيد التيتانيوم، خارج الجسم الحي.

Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO_2NPs) on *Entamoeba gingivalis* in vitro

Khansaa A. Younes Department of Dental Basic Sciences College of Dentistry/University of Mosul	Najah S. Nayef Department of Biology College of Science/University of Mosul	Ghada A. Taqa Department of Dental Basic Sciences College of Dentistry/University of Mosul
---	---	---

ABSTRACT

The effect of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO_2NPs) on *Entamoeba gingivalis* in vitro were studied, which isolated from gums in gingivitis patients who attended the periodontal disease department at the Faculty Dentistry of Mosul University for the period from 1/4/2018 to 31/7/2018.

In our study three different concentrations of (TiO_2NPs) were prepared as the following order: (0.1, 0.01, 0.001) mg/ml and evaluated the effect of these different concentrations through (2,4,6) hours. Results showed that time factor and the increasing of the apposite effect on the parasite killing and the highest concentration (0.1mg/ml) had a role in inhibition of parasite growth and reduced parasite survival rate to (3.60 ± 0.953) compared to the other concentrations. Also in this present study we found the concentration (0.1 mg/ml) was the highest inhibition of

parasite (86.73%) in the time period at (6 hours) compared to other concentrations and periods time which showed slight differences between them.

Keywords: *Entamoeba gingivalis*, Titanium Dioxide nanoparticles, *in vitro*.

المقدمة

يعد التجويف الفمي للإنسان موطن لكثير من الكائنات الدقيقة، إذ يمتلك عدد من الخصائص تجعله بيئة مميزة للأحياء المجهرية (Marsh, 2000) (Feki and Molet, 1990).

ويعد طفيلي *Entamoeba gingivalis* من الأولي الطفيلية Protozoa، يدعى الأميبا اللثوية وينتمي إلى شعبة اللحميات Sarcodina، صنف Rhizopodia، عائلة Entamoebidae، وهي أول أميبا وصفت في الإنسان من قبل Gros في 1849، يوجد بشكل طور خضري Trophozoite فقط (Pestechyan, 2002) يعيش في تجويف الفم لمرضى التهاب اللثة والتهاب اللوزتين الحنكي والجيوب الأنفية (Liu *et al.*, 2001) وفي حفر الأسنان وأنسجة اللثة المتقيحة وحفر اللوزتين (Roberts and Janovy, 2005) كذلك في مرضى نقص المناعة وذوي الفم غير الصحي (Liu *et al.*, 2001) وعلى سطح الأسنان، اللثة، جيوب اللثة قريباً من قاعدة السن، اللويحات البكتيرية، تكتلات السن في سائل محيط اللثة ولعاب المرضى بالتهاب اللثة (Maybodi, 2016)؛ (El-Azzouni and El-Badry, 1994)؛ (Albuquerque *et al.*, 2011). كما يوجد في مسحات الفم (Jian *et al.*, 2008 ; Bhaijee and Bell, 2011). وجد (Sarowaska *et al.*, 2004) و (Ghabanchi *et al.*, 2010) ان هناك علاقة بين تواجد الطفيل وحصول التهاب اللثة.

دورة حياة أميبا اللثة بسيطة و تتميز أو تشخص بطور واحد فقط هو طور الناشط Trophozoite (10-20) مايكروميتر ويمكن تمييزه بشكله الأميبي المتغاير والأقدام الكاذبة المتعددة (Monika *et al.*, 2011) وينتقل عن طريق التلامس المباشر بين شخص وآخر بالتقبيل وبالرذاذ المتطاير أو بمشاركة أدوات الطعام (Pestechyan, 2002)؛ (الحلبي, 2003). يحتوي الطفيلي على عدد من الفجوات الغذائية التي تحتوي على بقايا خلايا الدم البيض وخلايا طلائية (Eloufir *et al.*, 2014)، ان 95% من الأفراد ذوي الفم غير الصحي مصابين بهذا الطفيلي *Entamoeba gingivalis* (Pestechyan, 2002) و (Garcia, 2001).

إن الجزيئات النانوية NP_s: هي دقائق لها حجم بأبعاد (1-100) نانومتر ويمكن تصنيفها إلى أصناف مختلفة معتمدة على خواصها وشكلها وأحجامها (Ibrahim *et al.*, 2017)، فالجزيئات النانوية الهندسية هي جزيئات لها أبعاد خاصة (1-100) نانومتر ولها خواص فريدة لا تشترك بها مع الجزيئات ذات المقياس غير النانوي والتي لها نفس التركيب الكيميائي (Melanie *et al.*, 2009). تتضمن تقنية النانو إيجاد جزيئات بمواصفات دقيقة تعمل بكفاءة أعلى من المواد الأكبر حجماً وذات نفس التركيب الكيميائي (Scown, 2009)؛ (Wani *et al.*, 2011) ولهذه الجزيئات النانوية الصغيرة جداً القدرة على الدخول واختراق الحواجز الفسيولوجية وتلعب دوراً كبيراً في العدوى الجرثومية (Buses, 2007).

لقد أظهر استخدام التكنولوجيا الحيوية النانوية تقدماً كبيراً في علاج الإصابات الطفيلية إذ لخصائصها الفريدة تأثيرات مثبطة كبيرة للطفيليات (Das *et al.*, 2013)؛ (Elmi *et al.*, 2013)، مما جعلها تستخدم في علم الطب ومجالات واسعة (Buses, 2007)، لذا ارتأينا في هذه الدراسة تقييم تأثير الجزيئات النانوية لثنائي اوكسيد التيتانيوم على طفيلي اميبا اللثة خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل

تم جمع 120 عينة أخذت بشكل مسحات من جيب اللثة Gingival pocket وعينات لعاب من الاشخاص المصابين بأمراض اللثة Gingivits disease لفرع أمراض اللثة في المستشفى التعليمي لكلية طب الأسنان/جامعة الموصل وللفترة من 2018/4/1 ولغاية 2018/7/31 وقد اشتملت على كلا الجنسين ذكور وإناث وبمساعدة الطبيب الاختصاص، تم نقل العينات الى المختبر لغرض الفحص والتحري عن وجود الأميبا اللثوية، وتم تحضير المسحات الرطبة المباشرة Direct wet smears (Hasan *et al.*, 2018) حيث تم وضع قطرة من العينة المأخوذة على شريحة زجاجية نظيفة ووضع غطاء الشريحة وتم فحصها بقوة 40X للكشف عن وجود الأميبا وتمييز الحركة أو تمييز حركتها بالأقدام الكاذبة (Hersh, 1985).

تحضير الوسط الزرعي

تم الحصول على وسط زرعي سائل DMEM Liquid Dulbecco's Modified Eagle Medium من شركة GERMANY(GENAXXON bioscience) في عبوة بحجم 50مل والحاوي على 4.5غم/لتر كلوكوز Glucose، كلوتامين L- Glutamine مع بايروفيت الصوديوم Sodium Pyrovate و 3.7غم/لتر NaHCO₃ بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate.

تحضير محلول ثنائي أكسيد التيتانيوم النانوي (Tio₂ NPs)

تم تحضير 3 تراكيز من محلول ثنائي أكسيد التيتانيوم وبحجم 10 نانومتر وفقاً لطريقة (Ansari *et al.*, 2009) بوزن 1غم من دقائق ثنائي أكسيد التيتانيوم النانوي (Tio₂ NPs) ثم إضافته الى 10 مل من الماء المقطر المعقم، ووزن 1غم من Tio₂ ثم إضافته الى 100 مل من الماء المقطر المعقم، ووزن 1غم من Tio₂ وإضافته إلى 1000 مل من الماء المقطر المعقم، ومن ثم رجت يدوياً بقوة ولمدة 15 دقيقة للحصول على محلول متجانس وباستخدام المازج المغناطيسي magnetic stirrer وبذلك تم الحصول على التراكيز (0.1، 0.01، 0.001) ملغم/مل.

استنابات الطفيلي

تم تحضير 4 أنابيب اختبار نظيفة ومعقمة يحوي كل منها على 4 مل من الوسط الزرعي DMEM الملائم لنمو الطفيلي وتم إضافة 1مل من الوسط الحاوي على الطفيلي الى كل انبوب من هذه الأنابيب وتحت ظروف معقمة وتم إضافة التراكيز الثلاثة المحضرة من دقائق (Tio₂NPs) وهي: (0.1، 0.01، 0.001) ملغم/مل الى الانابيب بالترتيب وترك الانبوب الرابع بدون معاملة (للسيطرة)، حضنت الأنابيب الأربعة بدرجة 37م° في الحاضنة، فحصت العينات المعاملة بالتراكيز المختلفة من Tio₂NPs مقارنة مع مجموعة السيطرة خلال فترات زمنية مختلفة هي 2، 4، 6 ساعة، كررت التجربة 3 مرات للحصول على نتائج دقيقة.

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

تم استخدام اختبار دنكن متعدد المدى Duncan's Multiple Range test للتحري عن وجود فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة بالدراسة وبين مجموعة السيطرة.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي أن لتركيز دقائق ثنائي أكسيد التيتانيوم تأثير معنوي على معدل بقاء الطفيلي وعلى النسبة المئوية لتنشيط النمو مقارنة مع السيطرة كما لوحظ وجود علاقة عكسية بين زيادة التركيز ومعدل البقاء 10.13 ± 0.602 عند تركيز 0.001 ملغم/مل في حين بلغ $953+3.60$ عند تركيز 0.1 ملغم /مل بعد 6 ساعة من إضافة التركيز، كما أظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية واضحة بين التراكيز (0.001، 0.01، 0.1) ملغم/مل وبين مجموعة السيطرة بعد المعاملة بـ 6 ساعة (الجدول 1).

الجدول 1: تأثير ثنائي أكسيد التيتانيوم النانوي TiO_2 NPs في معدلات بقاء طفيلي أميبا اللثة المعامل بتراكيز مختلفة مقارنة بمجموعة السيطرة

Time(hour) Concentrations	2	4	6
Control	18.00 ± 0.3c	22.30 ± 0.20b	26.43 ± 0.513a
0.001	14.0 ± 0.36e	12.80 ± 0.20f	10.13 ± 0.602i
0.01	16.0 ± 0.40d	11.70 ± 0.20f	8.567 ± 0.305j
0.1	17.0 ± 0.264c	9.83 ± 0.37i	3.60 ± 0.953k

كل قيمة من القيم المدونة بالجدول تمثل معدل عدد الطفيليات لثلاث مكررات ± الخطأ القياسي

الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروقات معنوية

الحروف المختلفة تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) حسب اختبار دنكن متعدد المدى Duncan's Multiple Range.

في حين لم تظهر فروقات معنوية بين التراكيز 0.001، 0.01 ملغم/مل بعد الاضافة بـ 4 ساعة والتي أظهرت معدل بقاء 12.80 ± 0.20 و 11.70 ± 0.20 على التوالي مقارنة بالسيطرة التي أظهرت معدل بقاء 22.30 ± 0.20 . لوحظ من الجدول نفسه أن أفضل معاملة عند تركيز 0.1 ملغم/مل كانت ضمن 4 و 6 ساعة، وعند تركيز 0.01 ملغم/مل كانت ضمن 6 ساعة إذ أعطت فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($p < 0.05$). أما عن نسبة التثبيط فإن النسبة المئوية لتثبيط نمو الطفيلي القسوى والتي بلغت 37، 86% كانت عند التركيز 0.1 ملغم/مل بعد 6 ساعة من اضافة ثنائي أكسيد التيتانيوم، كما بلغت 67.61% عند التركيز 0.01 ملغم/مل و 61.67% عند التركيز 0.001 لنفس الفترة الزمنية (الجدول 2).

الجدول 2: تأثير ثنائي أكسيد التيتانيوم TiO_2 NPs النانوي في النسبة المئوية لتثبيط النمو ولفترات زمنية مختلفة

Time(hour) Concentrations	2 (%)	4(%)	6(%)
0.001	22.22	42.60	61.67
0.01	11.11	47.53	67.61
0.1	5.55	55.91	86.37

اتفقت نتائج الدراسة الحالية من حيث الفعالية التثبيطية لتراكيز ثنائي أكسيد التيتانيوم مع نتائج العديد من البحوث والدراسات لاختبار فعاليتها على عدد من الكائنات الحية الدقيقة كدراسة تأثير ثنائي أكسيد التيتانيوم النانوي في السيطرة على الخمج الثانوي لطفيلي المشوكات الحبيبية حيث كان لتراكيز (3,1.5,1,0.5,0.2,0.1,0.05) ملغم/مل من TiO_2 NPs تأثير على نسبة قتل الرؤيسات الأولية خارج الجسم الحي (Abd- Algany and Naef, 2018) واتفقت مع دراستنا الحالية بوجود علاقة عكسية بين معدل البقاء وزيادة التركيز وعامل الوقت.

تعود فعالية الجزيئات النانوية وخاصة التيتانيوم التي تولد أنواع الاوكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (Ros) التي تتكون في الطبيعة كمنتج ثانوي من الأيض الطبيعي والتي لها أدوار هامة في التوازن في الخلية. ان توليد Ros يؤدي الى تلف كبير في الهيكل الخلوي وبشكل تراكمي وهذا يتفق مع ما وجدته (Adil et al., 2011)؛ (Nawaz et al., 2011). أوضح Zheng et al., (2008) أن الجزيئات النانوية لها القابلية على الربط بقوة بين الكبريت والفسفور وبسبب هذه الخاصية فإنها يمكن أن تتلف غشاء الخلية عن طريق اعاقه تكوين البروتينات وقد تخترق خلايا الكائن الحي وتتلصق أنزيمات تحتوي على الكبريت والفسفور للحامض النووي أو قد تتراكم بشكل كبير داخل المايوتوكندريا وتضعف وظيفتها عن طريق الاجهاد التأكسدي (Asharani et al., 2009)؛ (Xia et al., 2006).

تم استخدام جزيئات نانو الذهب ضد الطفيليات والنواقل الحشرية (Benelli, 2017) وتعتبر جزيئات نانو المعدنية وخاصة الفضة من أكثر العوامل المفيدة كمضادات طفيلية متطورة في السيطرة على الطفيلي المهدب في الأسماك وخاصة كميبيد حشري بيئي سريع وآمن يمكن أن يكون طريقة متطورة كميبيد بايولوجي من جزيئات نانو الفضة. ان ميكانيكية توليد Ros داخل جزيئات نانو المعادن هي ميكانيكية رئيسية لموت الخلية المبرمج Apoptosis التي تتسبب عن جهد أكسدة مستحثة من قبل جزيئات النانو (Hsin et al., 2008)؛ (Eom and Choi, 2010)، وبما أن المايوتوكونديريا احدى الأعضاء المستهدفة الرئيسية لجهد الأكسدة فإن المستويات العالية من جزيئات النانو يمكن أن تسبب تحطم الدهون المفسفرة للغشاء وتحث على ازالة استقطاب غشاء المايوتوكونديريا (Lenaz, 2001) تكون مختلف أكاسيد المعادن لجزيئات النانو Ros الوسيط لموت الخلية عن طريق تعطيل وظيفة المايوتوكونديريا (Wang et al., 2005)؛ Zhang et al., (2011).

الاستنتاجات

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي ان ازدياد تركيز الجزيئات النانوية لمادة ثنائي اوكسيد التيتانيوم Tio₂NPs وعامل الوقت له تأثير ايجابي على قتل الطفيلي *Entamoeba gingivali* خارج الجسم الحي.

المصادر العربية

الحلبي، محمد خير (2003). "علم الطفيليات الطبية". الطبعة الأولى، مركز تعريب العلوم الصحية، الكويت.

المصادر الأجنبية

- Abd-Algany, R.A.; Naeef, N.S. (2018). The effect of using nanoparticles titanium dioxide to control of secondary infection of *Echinococcus granulosus* in vivo. *Raf. J. Sci.*, **27**(1), 85-96.
- Adil, M.; Allahverdiyev, E.S.A.; Malahat, B.; Cem, B. Ustundag, C.K.; Figen, K. (2011). Miriam rafailovich antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International J. Nanomed.*, **6**, 2705-2714.
- Albuquerque, R.L.C.; de Melo, C.M.; de Santana, W.A.; Ribeiro, J.L.; Silva, F.A. (2011). Incidence of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in samples of dental biofilm and saliva from patients with peri-odontal disease. *Rev Gaúcha Odontol*, **59**, 35-40.
- Ansari, M.A.; Haris, M.K.; Aijaz, A.K.; Asfia, S.; Ameer, A. (2009). Synthesis and characterization of the antibacterial potential of ZnO nanoparticles against extended-spectrum B-Lactamase-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital of North India. *Apple Microbiol Biotech.*, **10**, 3733-3736.
- Asharani, P.V.; Low K.; Mun, G.; Hande, M.P.; Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.*, **3**(2), 279-290.
- Benelli, G. (2017). Gold nanoparticles against parasites and insect vectors. Doi: 10.1016/ *J. actatropica*. **10**(021).
- Bhaijee, F.; Bell, D. (2011). *Entamoeba gingivalis* in acute osteomyelitis of the mandible. *Case Report Med*, 357301.
- Buses, C. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. **2**(4), 17-71.
- Das, S.; Bhattacharya, A.; Debnath, N.; Datta, A.; Goswami. (2013). Nanoparticle induced morphological transition of bombyx mori nucleopolyhedrovirus: a novel method to treat silkworm grasserie disease, *Appl: Microbiol: Biotechnol*. **97**(13), 6019-30.
- El-Azzouni, M.Z.; El Badry, A.M. (1994). Frequency of *Entamoeba gingivalis* among periodontal and patients under chemotherapy. *J. Egypt Soc. Parasitol.*, **24**, 649-655.

- Elmi, T.; Cholami, S.; Fakhar, M.; Azizi, F.(2013). A review on the use of nanoparticles in the treatment of parasitic infections. *J. Mazand Uni Med Sci.*, **23**,127-34.
- Eloufir, E.; Khelaiifia, S.; Aboudharam, G.; Drancourt, M. (2014). *In vitro* activity of metronidazole against *Entamoeba gingivalis*. *J. Infect Dis. Ther.*, **2**,(170).
- Eom, H.; Choi, J. (2010). p38 MAPK activation, DNA damage. cell cycle arrest and apoptosis mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environmental Science and Technol.*, **44**(21), 8337-8342.
- Feki, A.; Molet, B. (1990) Importance of *Trichomonas tenax* and *Entamoeba gingivalis* protozoa in the human oral cavity. *Rev. Odonto. Stomatol.*, **19**(1), 37-45.
- Garcia, L.S. (2001). "Diagnostic Medical Parasitology". 4th ed., ASM Press, Washington DC.
- Ghabanchi, J.; Zibaei, M.; Afkar, M.D.; Sarbazie, A.H. (2010). Prevalence of oral *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patient with periodontitis and healthy population in Shiraz, South Iran. *Ind. J. Dent. Res.* **21**(1), 89-915.
- Hasan, M.H.; ALAbbadi, A.; E.; Abdul Ruhman, N.R. (2018). Study of endoparasites of pigeons in Mosul City. *Raf. J. Sci.*, **1**(27),76-81.
- Hersh, S.M. (1985). Pulmonary trichomoniasis and *Trichomonas tenax*. *J. Med. Microbiol.* **20** ,1-10.
- Hsin, Y.; Chen, C.S.; Huang, T.; Shih, P.; Lai, P.J.; Chueh. (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters.* **179**(3),130-139.
- Ibrahim, K.; Khalid, S.; Idrees, k. (2017). Nanoparticale: properties, applications and toxicities. *J. arabic.*, **5**(011).
- Jian, B.; Kolansky, A.S.; Baloach, Z.W.; Gupta, P.K. (2008). *Entamoeba gingivalis* pulmonary abscess diagnosed by fine needle aspiration. *Cytojournal*, 30- 12.
- Lenaz, G. (2001). The mitochondrial production of reactive oxygern species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life.*, **52**(3-5),159-164.
- Liu, G.Y.; Chen J.F.; Wen, W.R.; Chen, W.L.; Lin, L.Q.; Hong, H.(2001). Experimental study on the pathogenesis of *Entamoeba gingivalis*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* , **19**,229-232.
- Marsh, P.D. (2000). "Oral Microbial Diversity in Oral Bacterial Ecology". The Molecular Basis Horizon Scientific Press, Wymondham, pp.11-56.
- Maybodi, F.R.; Ardakani, A.H.; Bafghi, A.F.; Ardakani, A.H.; Zafarbakhsh, A. (2016). The effect of nonsurgical periodontal therapy on *Trichomonas Tenax* and *Entamoeba gingivalis* in patients with chronic periodontitis. *J. Dent. Shiraz. Univ. Med. Sci.*, **17**, 171.
- Melanie, A.; Jerome, R.; Jean, Y. B.; Gregory, V. L; Jean, P. J; Mark, R.; Wiesner. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*. DOI:10. 1038. 242.
- Monika, D.; Edward, H.; Ewa, A.; Waldemar, J.W. (2011). Occurrence of *Entamoeba gingivalis* in the oral cavity of a students. *J. Stoma.*, **64**(10),784-795.
- Nawaz, H.R.; Solangi, B.A.; Zehra, B.; Nadem, U. (2011). Preparation of nano zinc oxide and its application in leather as a retaining and antibacterial agent. *Canadian J. Sci. and Industrial Research*, **2**(4),164-170.
- Pestechyan, N. (2002). "Frequency of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in Patients with Periodontal Disease and Healthy Controls in Isfahan Province". Proceeding of 4th Iranian Congress of Parasitology, Iran, Mashad, 117p.
- Roberts, L.; Janovy, J. (2005). "Foundation of Parasitology". The McGraw Hill Companies, U.S.A., pp. 114-11.
- Saleh, M.; Abdel-Baki, A.S.; Dkhil, M.A.; El-Matbouli, M.; Al-Quraishy, S. (2017). Antiprotozoal effects of metal nanoparticles against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology.* **144** (13), 1802-1810.

- Sarowaska, J.; Wojnicz, D.; Kackowski, H.; Jankowski, S. (2004). The Occurrence of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patient with periodontal disease. *Adv. Clin. Exp. Med.*, **13**(2), 29, 1-7.
- Scown, T. (2009). Uptake and Effects of Nanoparticles in Fish. Ph. D dissertation submitted to the University of Exeter, Biological Sciences.
- Veerakumar, K.; Govindarajan, M.; Rajeswary, M. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using sida acuta (malvaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi*, and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.*, **112**(12), 4073 – 85.
- Wang, L.; Bowman, L.; Lu, Y. (2005). Essential role of p53 in silica- induced apoptosis. *American J. Physiol.*, **288**(3), L488-L496.
- Wani, M.Y.; Hashim, M.A.; Nabi, F.; Malik, M.A.(2011)."Nanotoxicity: Dimensional and Morphological Concerns". Hindawi Publishing Corporation Advances in Physical Chemistry, Article ID 4509. **12** (15)
- Xia, T.; Kovochich, M.; Brant, J. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.*, **6**(8),1794-1807.
- Zhang, X.; Yin.; Tang, L.; Pu, L. (2011). ZnO, TiO₂, SiO₂, and Al₂O₃, nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts. *Biomedical and Environmental Sci.*, **24**(6), 661-669.
- Zheng, J.; Wu, X.; Wang, M.; Ran, D.; Xu, W.; Yang, J. (2008). Study on the interaction between silver nanoparticles and nucleic acids in the presence of Cetyltrimethyl ammonium 9 bromide and its analytical application. *Talanta*, **74** (4), 526-532.