



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی استان کرمان

دانشکده پزشکی مهندس افضلی پور

پایان نامه

جهت دریافت درجه ی دکترای پزشکی عمومی

عنوان

بررسی میزان اثر بخشی حامل گرافن حاوی آلبندازول بر روی پروتواسکولکس های کرم
اکینو کوکوس گرانولوزوس

استاد راهنما

دکتر محمدرضا لشکری زاده

استاد مشاور

دکتر علی درخشانی

پژوهش و نگارش :

محمد شفیعی

سال تحصیلی

(۱۳۹۹-۱۴۰۰)



**Kerman University of Medical Sciences
And Health Systems**

Thesis

To receive a doctorate in general medicine

Title:

**The Effects of the Albendazole-Loaded Graphene on The
Echinococcus Granulosus Protoscoleces: An Investigative In-vitro
Study**

Supervisor:

Dr. Mohammad Reza Lashkarizadeh

Advisor:

Dr. Ali Derakhshani

Research and writing:

Mohammad Shafie'ei

Date:

(September 2020)

فهرست مندرجات

و.....	چکیده فارسی
ط.....	چکیده انگلیسی
۱.....	فصل اول
۱.....	مقدمه و اهداف
۲.....	۱-۱ مقدمه
۲.....	۱-۲ بیان مساله و ضرورت موضوع
۶.....	۱-۳ اهداف کلی
۶.....	۱-۴ اهداف جزئی
۶.....	۱-۵ اهداف کاربردی
۸.....	فصل دوم
۸.....	مروری بر مطالعات انجام شده
۹.....	۲-۱ کلیات موضوع
۹.....	۲-۲ مروری بر پژوهشهای پیشین
۱۲.....	فصل سوم
۱۲.....	مواد و روشها
۱۳.....	۳-۱ روش تحقیق
۱۳.....	۳-۲ مواد و وسایل مصرفی:
۱۴.....	۳-۳ دستگاهها و تجهیزات مورد استفاده:
۱۵.....	۳-۴ تهیه بافر و محلولها
۱۵.....	۳-۴-۱- تهیه PBS (pH=7.2):
۱۶.....	۳-۵- جمع آوری نمونه های کیست هیداتید و استخراج پروتواسکولکس:
۱۷.....	۳-۶- تعیین میزان زنده بودن پروتواسکولکس ها:
۱۸.....	۳-۷- کشت انگل اکینوкокوکوس گرانولوزوس:
۲۷.....	فصل چهارم
۲۷.....	نتایج
۲۸.....	۴-۱ نتایج تحقیق
۳۳.....	فصل پنجم
۳۳.....	بحث و نتیجه گیری
۳۴.....	۵-۱ بحث و تفسیر
۳۶.....	منابع و مآخذ

فهرست جداول و نمودارها

جدول ۳-۱: مواد مصرفی.....	۱۳
جدول ۳-۲: تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده.....	۱۵
جدول ۳-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر PBS.....	۱۵
جدول ۳-۴: توالی پرایمرهای طراحی شده.....	۲۳
جدول ۴-۱: نتایج سنجش بیان ژن پروتواسکولکس‌ها در هر گروه نسبت به گروه کنترل ($p\text{-value} < 0.05$):*	۲۸
نمودار ۴-۱: نتایج بررسی بیان ژن Bax در گروه‌ها.....	۲۹
نمودار ۴-۲: نتایج بررسی بیان ژن Bcl-2 در گروه‌ها.....	۲۹
جدول ۴-۲: درصد پروتواسکولکس‌های زنده مانده در غلظت‌های مختلف دارو در هر گروه ($p\text{-value} < 0.05$):*	۳۱
نمودار ۴-۳: درصد پروتواسکولکس‌های زنده مانده در غلظت‌های مختلف دارو در هر گروه.....	۳۲

فهرست کوتاه نوشته‌ها (Abbreviations)

<i>Abbreviations</i>	
CE	<i>Cystic echinococcosis</i>
AE	<i>Alveolar echinococcosis</i>
DALY	<i>Disability-adjusted life year</i>
CT	<i>Computed tomography</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
PAIR	<i>Puncture, aspiration, injection, and reaspiration</i>
BMZ	<i>Benzimidazole</i>
ABZ-SO	<i>Albendazole sulfoxide</i>
GFN	<i>Graphene Nanomaterials</i>
GNR	<i>Graphene Nanoribbons</i>
GQD	<i>Graphene Quantum Dots</i>
EPR Effect	<i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i>
ABZ-SLN	<i>Albendazole Solid Lipid Nanoparticles</i>
ABZ-LNC	<i>Lipid nanocarriers</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
PSCs	<i>Protoscoleces</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
PLGA-PEG	<i>Poly(lactic acid-co-glycolic acid)-Poly(ethylene glycol)</i>

چکیده فارسی

چکیده

مقدمه و اهداف: اکینوکوکوس یا بیماری هیداتید یک عفونت مشترک بین انسان و حیوانات است که توسط گروهی از سستودها (کرم‌های نواری)، متعلق به خانواده *Taeniidea*، که عمدتاً سگ‌ها و روباه‌ها را درگیر می‌کنند ایجاد می‌شود در حالی که میزبانان واسط انسان و گاو و گوسفند هستند. کنترل این بیماری دشوار بوده که یکی از علل آن اثربخشی و زیست‌فراهمی نسبتاً پایین آلبندازول به عنوان داروی انتخابی، است.

روش تحقیق: در این مطالعه مداخله‌ای-تجربی فاز *in-vitro*، پروتواسکولکس‌های جداسازی شده و کشت یافته به چهار گروه کنترل، دریافت‌کننده گرافن، آلبندازول و گرافن حاوی آلبندازول تقسیم شده و سپس از جهت بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* و همچنین میزان زنده ماندن پس از تماس با ترکیب گروه خود، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در گروه گرافن حاوی آلبندازول، نسبت به گروه کنترل، بیان ژن *Bax* (نشانه‌گر آپوپتوز سلولی) در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱۸، ۵۰ و ۱۲۱ درصد افزایش داشت. همچنین در این گروه بیان ژن *Bcl-2* (نشانه‌گر زیایی سلولی) به ترتیب ۱۸، ۳۸ و ۶۴ درصد کاهش یافت. در این گروه همچنین درصد پروتواسکولکس‌های زنده مانده پس از اثرگذاری دارو در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب حدود ۲۴، ۴۹، ۹۳ و ۹۹ درصد کاهش یافته بود. آلبندازول سوار شده بر گرافن نسبت به آلبندازول بدون حامل حدود ۱۸ درصد اثربخشی بیشتر در کشتن پروتواسکولکس‌ها و به ترتیب ۱۴ و ۳۱ درصد اثربخشی بیشتر در کاهش بیان ژن‌های نشانه‌گر زیایی و افزایش بیان ژن‌های نشانه‌گر آپوپتوز داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: گرافن، علی‌رغم نداشتن کشندگی قابل توجه بر روی پروتواسکولکس‌ها، میزان کشندگی آلبندازول را به مقدار قابل توجهی افزایش داده بود و لذا می‌تواند حامل بسیار مناسبی جهت بهبود عملکرد درمانی این دارو در بیماری هیداتید باشد. جهت بررسی بیشتر زوایای این اثرگذاری و

عوارض احتمالی این ترکیب، توصیه میشود مطالعات فاز *in-vivo* و انسانی نیز در پیش گرفته شوند. در صورت حصول نتایج قابل توجه در این مطالعات میتوان به بهبود شرایط کنترل بیماری هیداتید بسیار امیدوار بود.

کلمات کلیدی: اکینوкокوکوس، آلبندازول، گرافن، حامل نانو، پروتواسکولکس، **Bax**، **Bcl-2**

چکیده انگلیسی

Abstract:

Introduction: Echinococcosis, or hydatid disease, is a zoonotic infection caused by a group of cestodes (tapeworms) of the Taeniidea family that mainly affect dogs and foxes, while humans, cattle, and sheep are the intermediate hosts. The disease is difficult to manage, and one of the reasons is the relatively low efficacy and bioavailability of albendazole, the drug of choice.

Methods: In this in-vitro study, isolated and cultured protoscoleces were divided into four groups based on the regimen they would receive, consisting of control, graphene, albendazole, and graphene containing albendazole. The level of Bax and Bcl-2 gene expressions after the exposure and the percentage of survived protoscoleces were evaluated and compared in each group.

Results: In the graphene group containing albendazole, compared to the control group, the expression of the Bax gene (a marker for cell apoptosis) at concentrations of 10, 20, and 50 µg/ml increased by 18, 50, and 121%, respectively. The expression of the Bcl-2 gene (a marker for cell fertility) decreased by 18, 38, and 64%, respectively. Furthermore, the percentage of protoscoleces surviving after exposure to concentrations of 1, 10, 20, and 50 µg/ml reduced by about 24, 49, 93, and 99%, respectively. The graphene-loaded albendazole was about 18% more effective in killing protoscoleces than albendazole alone and 14 and 31% more effective in improving the expression of specified fertility and apoptosis genes, respectively.

Discussion: Graphene, despite not having significant lethality on protoscoleces, significantly increased the lethality of albendazole and therefore could potentially be an excellent carrier for improving the therapeutic outcome of albendazole in hydatid disease. In order to further investigate the possible effects and side effects of this nano complex, it is recommended that in-vivo and human phase studies be undertaken. If significant results are demonstrated, it would tremendously improve the management of hydatid disease.

Keywords: Echinococcus, Echinococcosis, Albendazole, Graphene, Nanocarriers, Protoscoleces, Bax, Bcl-2

منابع و مأخذ

- ١١) McManus DP, Gray DJ, Zhang W, Yang Y. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *Bmj*. 2012;344:e3866.
- ١٢) Romig T, Deplazes P, Jenkins D, Giraudoux P, Massolo A, Craig PS, et al. Ecology and Life Cycle Patterns of Echinococcus Species. *Adv Parasitol*. 2017;95:213-314.
- ١٣) Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(٢)
- ١٤) Ebrahimipour M, Rezaeian S, Shirzadi MR, Barati M. Prevalence and risk factors associated with human cystic echinococcosis in Iran. *J Parasit Dis*. 2019;43(3):385-92.
- ١٥) Moosazadeh M, Abedi G, Mahdavi SA, Shojaee J, Charkame A, Afshari M. Epidemiological and clinical aspects of patients with hydatid cyst in Iran. *J Parasit Dis*. 2017;41.٣٥٦-٦٠.(٢)
- ١٦) Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):296-303.
- ١٧) Stamatakis M, Sargedi C, Stefanaki C, Safioleas C, Matthaiopoulou I, Safioleas M. Anthelmintic treatment: an adjuvant therapeutic strategy against *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Int*. 2009;58(2):115-20.
- ١٨) Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop*. 2010;114(1):1١٦-
- ١٩) Dehkordi AB, Sanei B, Yousefi M, Sharafi SM, Safarnezhad F, Jafari R, et al. Albendazole and Treatment of Hydatid Cyst: Review of the Literature. *Infect Disord Drug Targets*. 2019;19(2):101-4.
- ٢٠) Bakhtiar NM, Akbarzadeh A, Casulli A, Mahami-Oskouei M, Ahmadpour E, Nami S, et al. Therapeutic efficacy of nanocompounds in the treatment of cystic and alveolar echinococcoses: challenges and future prospects. *Parasitol Res*. 2019;118(9):2455-66.
- ٢١) Bloom AK, Ryan ET. Albendazole. In: Magill AJ, Hill DR, Solomon T, Ryan ET, editors. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition)*. London: W.B. Saunders; 2013. p. 1088-9.
- ٢٢) Cherry J, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL, Steinbach WJ, Hotez PJ. *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases E-Book: 2-Volume Set*: Elsevier Health Sciences; 2013.

- .۱۳ Davis A, Dixon H, Pawlowski ZS. Multicentre clinical trials of benzimidazole-carbamates in human cystic echinococcosis (phase 2). *Bull World Health Organ*. 1989;67(5):503-8.
- .۱۴ Horton RJ. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta Trop*. 1997;64(1-2):79-93.
- .۱۵ Pensel PE, Castro S, Allemandi D, Bruni SS, Palma SD, Elissondo MC. Enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy of albendazole formulated as solid dispersions in experimental cystic echinococcosis. *Vet Parasitol*. 2014;203(1-2):80-6.
- .۱۶ Kapan S, Turhan AN, Kalayci MU, Alis H, Aygun E. Albendazole is not effective for primary treatment of hepatic hydatid cysts. *J Gastrointest Surg*. 2008;12(5):867-71.
- .۱۷ Lange H, Eggers R, Bircher J. Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. *European journal of clinical pharmacology*. 1988;34(3):315-7.
- .۱۸ Vural G, Yardimci M, Kocak M, Yasar T, Kurt A, Harem IS, et al. Efficacy of novel albendazole salt formulations against secondary cystic echinococcosis in experimentally infected mice. *Parasitology*. 2020;147(13):1425-32.
- .۱۹ Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*. 2004;306(5696):666-9.
- .۲۰ Joshi K, Mazumder B, Chattopadhyay P, Bora NS, Goyary D, Karmakar S. Graphene Family of Nanomaterials: Reviewing Advanced Applications in Drug delivery and Medicine. *Curr Drug Deliv*. 2019;16(3):195-214.
- .۲۱ Lu N, Wang L, Lv M, Tang Z, Fan C. Graphene-based nanomaterials in biosystems. *Nano Res*. 2019;12(2):247-64.
- .۲۲ Zhao X, Wei Z, Zhao Z, Miao Y, Qiu Y, Yang W, et al. Design and Development of Graphene Oxide Nanoparticle/Chitosan Hybrids Showing pH-Sensitive Surface Charge-Reversible Ability for Efficient Intracellular Doxorubicin Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(7):6608-17.
- .۲۳ Li R, Wang Y, Du J, Wang X, Duan A, Gao R, et al. Graphene oxide loaded with tumor-targeted peptide and anti-cancer drugs for cancer target therapy. *Scientific Reports*. 2021;11.(۱)
- .۲۴ Chen B, Liu M, Zhang L, Huang J, Yao J, Zhang Z. Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(21):7736-41.

- ۲۵ Yao C, Tu Y, Ding L, Li C, Wang J, Fang H, et al. Tumor Cell-Specific Nuclear Targeting of Functionalized Graphene Quantum Dots In Vivo. *Bioconjug Chem.* 2017;28(10):2608-19.
- ۲۶ Lu B, Li T, Zhao H, Li X, Gao C, Zhang S ,et al. Graphene-based composite materials beneficial to wound healing. *Nanoscale.* 2012;4(9):2978-82.
- ۲۷ Karahan HE, Wiraja C, Xu C, Wei J, Wang Y, Wang L, et al. Graphene Materials in Antimicrobial Nanomedicine: Current Status and Future Perspectives. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(13):e1701406.
- ۲۸ Albalawi AE, Alanazi AD, Baharvand P, Sepahvand M, Mahmoudvand H. High Potency of Organic and Inorganic Nanoparticles to Treat Cystic Echinococcosis: An Evidence-Based Review. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10.(۱۲)
- ۲۹ Nassef NE, Saad AE, Harba NM, Beshay EVN, Gouda MA, Shendi SS, et al. Evaluation of the therapeutic efficacy of albendazole-loaded silver nanoparticles against *Echinococcus granulosus* infection in experimental mice. *J Parasit Dis.* 2019;43(4):658-71.
- ۳۰ Wen H, New RR, Muhmut M, Wang JH, Wang YH, Zhang JH, et al. Pharmacology and efficacy of liposome-entrapped albendazole in experimental secondary alveolar echinococcosis and effect of co-administration with cimetidine. *Parasitology.* 1996;113 (Pt 2):111.۲۱-
- ۳۱ Rieger IM, Schipper HG, Koopmans RP, van Kan HJ, Frijlink HW, Kager PA, et al. Relative bioavailability of three newly developed albendazole formulations: a randomized crossover study with healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48.۱۰۵۱-۴:(۳)
- ۳۲ Ahmadnia S, Moazeni M, Mohammadi-Samani S, Oryan A. In vivo evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide loaded solid lipid nanoparticles against hydatid cyst. *Exp Parasitol.* 2013;135(2):314-9.
- ۳۳ Aminpour S, Rafiei A, Jelowdar A, Kouchak M. Evaluation of the Protoscolicidal Effects of Albendazole and Albendazole Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Iran J Parasitol.* 2019;14(1):127-35.
- ۳۴ Darvishi MM, Moazeni M, Alizadeh M, Abedi M, Tamaddon AM. Evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide (ABZ-SO)-loaded chitosan-PLGA nanoparticles in the treatment of cystic echinococcosis in laboratory mice. *Parasitol Res.* 2020;119(12):4233-41.
- ۳۵ Pensel PE, Ullio Gamboa G, Fabbri J, Ceballos L, Sanchez Bruni S, Alvarez LI, et al. Cystic echinococcosis therapy: Albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the

oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. *Acta Trop.* 2015;152:185-94.

.۳۶ Ullio Gamboa GV, Pensel PE, Elissondo MC, Sanchez Bruni SF ,Benoit JP, Palma SD, et al. Albendazole-lipid nanocapsules: Optimization, characterization and chemoprophylactic efficacy in mice infected with *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol.* 2019;198:79-86.

.۳۷ Gollavelli G, Ling YC. Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe. *Biomaterials.* 2012;33(8):2532-45.

.۳۸ Zhang W, Wang C, Li Z, Lu Z, Li Y, Yin JJ, et al. Unraveling stress-induced toxicity properties of graphene oxide and the underlying mechanism. *Adv Mater.* 2012;24(39):5391-7.

.۳۹ Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson JT, Goodwin A, Zaric S, et al. Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. *Nano Res.* 2008;1(3):203-12.

.۴۰ Ding H, Zhang F, Zhao C, Lv Y, Ma G, Wei W, et al. Beyond a carrier: graphene quantum dots as a probe for programmatically monitoring anti-cancer drug delivery, release, and response. *ACS applied materials & interfaces.* 2017;9(33):27396-401.

.۴۱ Pandey H, Parashar V, Parashar R, Prakash R, Ramteke PW, Pandey AC. Controlled drug release characteristics and enhanced antibacterial effect of graphene nanosheets containing gentamicin sulfate. *Nanoscale.* 2011;3(10):4104-8.

.۴۲ Huang T, Zhang L, Chen H, Gao C. A cross-linking graphene oxide–polyethyleneimine hybrid film containing ciprofloxacin: One-step preparation, controlled drug release and antibacterial performance. *Journal of Materials Chemistry B.* 2015;3(8):1605-11.

.۴۳ Matulewicz K, Kaźmierski Ł, Wiśniewski M, Roszkowski S, Roszkowski K, Kowalczyk O, et al. Ciprofloxacin and Graphene Oxide Combination-New Face of a Known Drug. *Materials (Basel).* 2020;13.(۱۹)

.۴۴ Wang Y, Zhang D, Bao Q, Wu J, Wan Y. Controlled drug release characteristics and enhanced antibacterial effect of graphene oxide–drug intercalated layered double hydroxide hybrid films. *Journal of Materials Chemistry.* 2012;22(43):23106-13.

.۴۵ Smyth J, Barrett N. Procedures for testing the viability of human hydatid cysts following surgical removal, especially after chemotherapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1980;74(5):649-52.

.۴۶ Smyth J, Miller HJ, Howkins A. Further analysis of the factors controlling strobilization, differentiation, and maturation of *Echinococcus granulosus* in vitro. *Experimental Parasitology.* 1967;21(1):31-41.

- .۴۷ Smyth J, Davies Z. In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results. *International Journal for Parasitology*. 1974;4(6):631-44.
- .۴۸ Mohammadzadeh T, Sadjjadi S, Rahimi H, Shams S. Establishment of a modified in vitro cultivation of protoscoleces to adult *Echinococcus granulosus*; an important way for new investigations on hydatidosis. *Iranian journal of parasitology*. 2012;7(1):59.
- .۴۹ Zou F, Wang X, Han X, Rothschild G, Basu U, Sun J. Expression and Function of Tetraspanins and Their Interacting Partners on B cells. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1606.
- .۵۰ Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80(6):1339.-
- .۵۱ Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, et al. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano*. 2010;4(8):4806-14.
- .۵۲ Çolak B, Aksoy F, Yavuz S, Demircili ME. Investigating the effect of gold nanoparticles on hydatid cyst protoscolices under low-power green laser irradiation. *Turk J Surg*. 2019;35(4):314-20.
- .۵۳ Norouzi R, Ataei A, Hejazy M, Noreddin A, El Zowalaty ME. Scolicidal Effects of Nanoparticles Against Hydatid Cyst Protoscolices in vitro. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:1095-100.
- .۵۴ Naseri M, Akbarzadeh A, Spotin A, Akbari NA, Mahami-Oskouei M, Ahmadpour E. Scolicidal and apoptotic activities of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide-loaded PLGA-PEG as a novel nanopolymeric particle against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitol Res*. 2016;115(12):4595-603.
- .۵۵ Ezzatkhan F, Khalaf AK, Mahmoudvand H. Copper nanoparticles: Biosynthesis, characterization, and protoscolicidal effects alone and combined with albendazole against hydatid cyst protoscoleces. *Biomed Pharmacother*. 2021;13۶:۱۱۱۲۵۷

