Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019

Original Article

Synergistic effect of application of direct current electricity in combination with selenium nanoparticles on the killing of *Leishmania major* promastigotes *in vitro*

Jamei F, Dalimi–Asl A*, Karimi M, Dalimi Ab, Ghaffarifar F

Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran

Received May 6, 2015; Accepted October 19, 2015

Abstract:

Background: Regarding some reports on the resistance of *Leishmania* to Glucantime and the absence of an effective vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis, there is an urgent need to identify a new and effective therapeutic method. Therefore, the present study aimed to examine the effect of direct current electricity in combination with selenium nanoparticles on the killing of *Leishmania major* in vitro.

Materials and Methods: In this experimental study, the effect of different concentrations of selenium nanoparticles was evaluated against *Leishmania major* promastigotes in vitro. In the second step, the killing effect of selenium nanoparticles alone or in combination with 3 mA direct electric current was assessed in promastigote culture for 10 minutes. Then, the survival rate of the infected promastigotes was evaluated using the Microculture Tetrazolium Assay.

Results: The various concentrations of selenium nanoparticles significantly decreased the number of live promastigotes over time. Based on the parasite count, the half inhibitory concentration (IC50) of the nanoparticles was calculated 12.5 µg/ml after 24 hours of cultivation. Using selenium nanoparticles alone at the concentration of 100 µl/ml and in combination with 3 mA direct current electricity after 10 minutes caused 37.1% and 91.5% mortality in the promastigotes, respectively.

Conclusion: Although the use of selenium nanoparticles alone cannot kill the *Leishmania major* promastigotes completely, the combined use of both direct current electricity and selenium nanoparticles has a significant synergistic effect on promastigote mortality.

Keywords*:* *Leishmania major*, Selenium nanoparticles, Direct current electricity, in vitro

*** Corresponding Author.**
Email: dalimi_a@modares.ac.ir
Tel: 0098 218 288 3838
Fax: 0098 218 288 3838

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2016; Vol. 19, No 6, Pages 468-475

Please cite this article as: Jamei F, Dalimi–Asl A, Karimi M, Dalimi Ab, Ghaffarifar F. Synergistic effect of application of direct current electricity in combination with selenium nanoparticles on the killing of *Leishmania major* promastigotes *in vitro*. ***Feyz*** 2016; 19(6): 468-75.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019

اثرات هم‌افزایی کاربرد جریان مستقیم الکتریسیته همراه با نانوذرات سلنیوم در کشندگی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در شرایط برون‌تنی

فرنوش جامعی [۱]، عبدالحسین دلیمی اصل [۲*]، مهدی کریمی [۱]، عباس دلیمی [۳]، فاطمه غفاری‌فر [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: باتوجه به برخی گزارش‌ها در مورد مقاومت انگل لیشمانیا نسبت به گلوکانتیم و عدم وجود واکسن برای پیشگیری از لیشمانیوز جلدی، نیاز فوری برای شناسایی روش‌های درمانی جدید و موثر اجتناب ناپذیر است. در مطالعه حاضر تاثیر جریان مستقیم به همراه نانوسلنیوم در کشندگی *لیشمانیا ماژور* در محیط کشت بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی اثر غلظت‌های مختلف نانوسلنیوم در شرایط برون‌تنی بر علیه پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در مرحله دوم، اثر کشندگی نانوسلنیوم به‌تنهایی و یا در ترکیب با ۳ میلی‌آمپر جریان الکتریسته مستقیم در محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه بررسی و میزان بقای انگل‌ها با استفاده از آزمون MTT (Microculture Tetrazolium Assay) محاسبه شد.

نتایج: در غلظت‌های مختلف نانوسلنیوم با گذشت زمان، تعداد پروماستیگوت‌ها به‌صورت معنی‌دار کاهش یافت. با استفاده از نتایج شمارش انگل، IC50 دارو ۲۴ ساعت پس از کشت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. نانوسلنیوم در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر در میلی‌متر پس از ۱۰ دقیقه مصرف به‌تنهایی باعث مرگ و میر ۳۷/۱ درصد و همراه با القا ۳ میلی‌آمپر جریان مستقیم الکتریسیته باعث مرگ‌ومیر ۹۱/۵ درصد پروماستیگوت‌ها گردید.

نتیجه‌گیری: اگرچه استفاده از نانوسلنیوم سبب کشتن کامل پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* نمی‌گردد، ولی مصرف توام جریان مستقیم الکتریسیته و نانوسلنیوم اثر هم‌افزایی قابل توجهی در کشندگی پروماستیگوت‌ها دارد.

واژگان کلیدی: *لیشمانیا ماژور*، نانوذرات سلنیوم، جریان الکتریسیته مستقیم، شرایط برون‌تنی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۴، صفحات ۴۷۵-۴۶۸

مقدمه

لیشمانیوزیس جزء بیماری‌های عفونی مهم دنیاست که توسط تک‌یاخته‌های نسجی خونی داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا از راسته کینتوپلاست‌داران در ماکروفاژهای ترجیحا پوست، کبد، طحال، مغز استخوان ایجاد می‌شود. بسته به گونه انگل به چهار فرم اصلی جلدی، جلدی مخاطی، جلدی منتشر و احشایی مشاهده می‌شود [۱]. تخمین زده شده که بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مورد تهدید این بیماری هستند [۱].

طبق آمار وزارت بهداشت سالانه حدود ۱۵ هزار نفر در کشور ایران به بیماری سالک مبتلا می‌شوند که بنابر تحقیقات موجود میزان واقعی آن ۴ تا ۵ برابر این مقداری است که گزارش می‌شود. میزان بروز بیماری در ایران ۰/۲۸ در هر هزار نفر جمعیت تخمین زده می‌شود [۲]. در استفاده از روش‌های درمانی مختلف بر علیه لیشمانیوز به‌علت مواجه شدن با مشکلاتی مانند عود بیماری، مقاومت نسبت به داروها، عوارض جانبی داروها، ایجاد عفونت ثانویه باکتریایی، هزینه زیاد و گزارش بیماری در افراد با نقص ایمنی، تحقیقات در زمینه معرفی داروهای جدید ضد لیشمانیا و یا یک واکسن مناسب رونق یافته است [۱]. اصولا درمان لیشمانیوز به عواملی مانند موقعیت زخم، تعداد زخم، اندازه گستره زخم، نو یا کهنه بودن زخم و هم‌چنین احتمال توسعه زخم به بخش مخاطی بستگی دارد [۲]. بیماری سالک غالبا خودبه‌خود بهبود می‌یابد، ولی به‌علت مزمن شدن ضایعات و گسترش آنها و باقی ماندن جوشگاه-های بدشکل، انجام درمان ضایعات پوستی به‌ویژه ضایعات روی پوست صورت اجتناب ناپذیر است. مشکل درمانی لیشمانیوز پوستی از دیرباز مورد توجه بوده و درمان‌های مختلفی برای این بیماری پیشنهاد شده است ولی، متأسفانه هیچ‌کدام به‌صورت کامل مؤثر نبوده است. تزریق داخل ضایعه‌ای داروهای ضد لیشمانیایی

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] استاد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد برق قدرت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه

[۴] استاد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

*نشانی نویسنده مسئول:

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی و حشره شناسی

تلفن: ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۳۸ دورنویس: ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۳۸

پست الکترونیک: dalimi_a@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۶ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۷/۲۷

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019

روش درمانی است که برای دهه‌های طولانی استفاده شده است [۱]. آنتیموان‌های ۵ ظرفیتی، استیبوگلوکونات یا پنتوستام، گلوکانتیم، میلتفوسین، آمفوتریسین لیپوزومال، کتوکونازول و آلوپورینول از داروهای مورد استفاده در درمان این بیماری هستند [۷-۳]. ترکیبات آنتیموان اغلب سمی هستند. لذا جهت جلوگیری و یا کاهش سمیت داروهای آنتیموان، آنها را داخل کپسول‌های لیپوزومی عرضه می‌کنند [۹،۸]. مقاومت انگل نسبت به آنتیموان‌ها، از معایب دیگر این داروها است [۱۰] که علت آن غیر کافی بودن دوز مصرفی و متفاوت بودن دوزهای آنتیموان گزارش شده است [۱۱،۱۲]. از این‌رو، برخی محققان مصرف اینترفرون گاما را همراه آنتیموان‌ها تجویز کرده‌اند [۱۳]. برای درمان ضایعه پوستی لیشمانیایی تاکنون از ابزارهای فیزیکی و ترکیبات مختلفی اعم از داروهای شیمیایی، گیاهی و حتی نانوذرات استفاده شده است. شواهد و مدارک زیادی وجود دارد که جریان الکتریکی می‌تواند رشد باکتری‌ها را مهار کند [۱۴]. از طرفی از سال‌های متمادی از جریان الکتریسته جهت بهبود زخم نیز استفاده می‌شده است [۱۵]. علاوه بر این، اثر جریان الکتریسته بر روی پروماستیگوت و بهبود زخم لیشمانیایی، مورد ارزیابی قرار گرفته است [۱۷،۱۶]. در مورد اثرات نانوذرات مختلف از جمله سلنیوم بر روی پروماستیگوت و بهبود زخم لیشمانیایی نیز مطالعاتی انجام شده است [۲۷-۱۸]. هدف از انجام این مطالعه مقایسه تاثیر جریان‌های مستقیم الکتریسیته همراه با نانوذرات سلنیوم و یا بدون آن، در کشندگی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به‌صورت تجربی-در آزمایشگاه گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۱۳۹۳ انجام شد. سویه استاندارد (MRHO.IR.75.ER) از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شده و برای تهیه مقدار انگل مورد نیاز، پاساژهای متوالی داده شد. برای کشت و نگهداری انگل از دو محیط NNN تغییر یافته و RPMI1640 استفاده شد. ابتدا انگل در محیط NNN تغییر یافته و سپس در محیط RPMI1640 کشت داده شد. به‌منظور کشت انگل لیشمانیا، محیط RPMI1640 به‌صورت آماده از شرکت Gibco انگلیس خریداری شد. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها 100 unit/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین و به‌عنوان ماده مکمل سرم جنین گوساله (FBS) ۱۵-۱۲ درصد به محیط اضافه شد. سپس، فلاسک‌ها به انکوباتور ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و هر روز با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. در صورتی‌که رنگ محیط زرد شده و پروماستیگوت‌ها وارد فاز ایستا می‌شدند، محیط کشت جدید به آنها اضافه می‌گردید. این کار تا زمانی انجام می‌شد که تعداد انگل به میزان مورد نیاز بالا رود. برای شمارش تعداد انگل از لام نئوبار و برای تعیین تعداد انگل در هر میلی‌لیتر از فرمول زیر استفاده شد: ۱۰۰۰×۱۰×میانگین تعدادانگل در ۴ خانه شمارش WBC نئوبار = N (تعداد انگل در هر میلی‌لیتر).

نانوذره سلنیوم مورد استفاده، تولید کشور آمریکا، به‌صورت محلول و به رنگ قرمز بوده و از شرکت جهان ثانی طوس مشهد خریداری شد. غلظت اولیه نانوذره ppm ۳۰۰۰ و اندازه آن ۱۵-۱۰ نانومتر بود. غلظت‌های ۶، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره تهیه شد. برای تبدیل جریان AC به DC از دستگاه واریاک استفاده شد. این دستگاه به‌عنوان ترانسفورماتور جهت کاهش یا افزایش ولتاژ استفاده می‌شود. برای اندازه گیری دقیق‌تر ولتاژ، از دستگاه مولتی‌متر استفاده شد. در مطالعه حاضر برای بهینه سازی جریان‌های مختلف الکتریسته، ولتاژهای ۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۵ میلی‌آمپر و الکترودهایی از جنس استیل، مس، نقره و طلا از لحاظ تولید گرما و تغییر pH محیط مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت الکترود طلا و جریان مستقیم ۳ میلی‌آمپر به‌مدت ۱۰ دقیقه انتخاب شد. باتوجه به اینکه محیط کشت RPMI 1640 و هم‌چنین سایر محیط کشت‌هایی که به‌منظور کشت پروماستیگوت استفاده می‌شوند، حاوی مقادیر زیادی آب و انواع نمک می‌باشند، لذا از مفتول‌های طلا به‌عنوان الکترود استفاده شد که دارای بالاترین رسانایی، کمترین میزان تجزیه و کمترین مقدار گرمای تولید شده بود. در مجموع پنج گروه شامل گروه شاهد بدون مواجهه، گروه مواجهه با جریان الکتریسته، گروه مواجهه با نانو ذرات سلنیوم، گروه مواجهه همزمان با جریان الکتریسته و ذرات سلنیوم و گروه مواجهه با آمفوتریسین ب گروه بندی شدند. لازم به‌ذکر است که از آمفوتریسین ب به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمون تعیین غلظت ممانعت از رشد ۵۰ درصدی (IC50) بر پایه ممانعت یا مهار رشد تعداد مشخص انگل زنده و فعال *لیشمانیا ماژور* به فرم پروماستیگوت (تعداد اولیه ۲×۱۰^{۶} پروماستیگوت) در حضور غلظت‌های ۶، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات سلنیوم ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت پس از کشت انجام شد. ابتدا انگل‌های زنده و فعال لیشمانیا ماژور که به‌صورت فرم پروماستیگوت در محیط وجود داشتند در روزهای متوالی شمارش شد و هنگامی که تعداد انگل در هر میلی‌لیتر به ۲×۱۰^{۶} رسید این تعداد انگل مورد مطالعه قرار گرفت. برای این کار، پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل را در زیر هود با شرایط کاملا استریل قرار داده و سپس به هر چاهک آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019

انگل حاوی پروماستیگوت و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI-1640+FCS ۲۶ درصد اضافه شد. بعد از این عمل، غلظت‌های مختلف دارو به‌چاهک‌ها اضافه شد. لازم به‌ذکر است که تمام این آزمایش‌ها به‌صورت تری پلیت انجام شده است و یک پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت، پلیت دوم به‌مدت ۴۸ ساعت و پلیت سوم به‌مدت۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هم‌چنین، یکی از چاهک‌های هر پلیت فقط دارای پروماستیگوت و محیط بوده که این چاهک به‌عنوان کنترل آزمون در نظر گرفته شد. پس از سپری شدن زمان‌های مورد نظر انگل‌ها شمارش شده و IC50 هر سه روز توسط نرم‌افزار prism 5 به‌دست آمد و میزان ممانعت از رشد سنجیده شد. برای ارزیابی میزان بقای پروماستیگوت آلوده به انگل، آزمون MTT در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الیزا ریدر قرائت شد. پس از به‌دست آوردن جذب نوری نمونه‌ها از فرمول زیر، درصد بقای سلول محاسبه شد: [AT-AB] / [AC-AB]×100.

AT، جذب نوری نمونه؛ AB، جذب نوری بلانک؛ و AC، جذب نوری شاهد.

برای تشخیص تفاوت معنی‌دار بین دوگروه از آزمون t و بین چند گروه از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way) استفاده گردید و از آزمون کولموگوروف- اسمیرنوف برای بررسی فرض نرمال بودن متغیرها استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

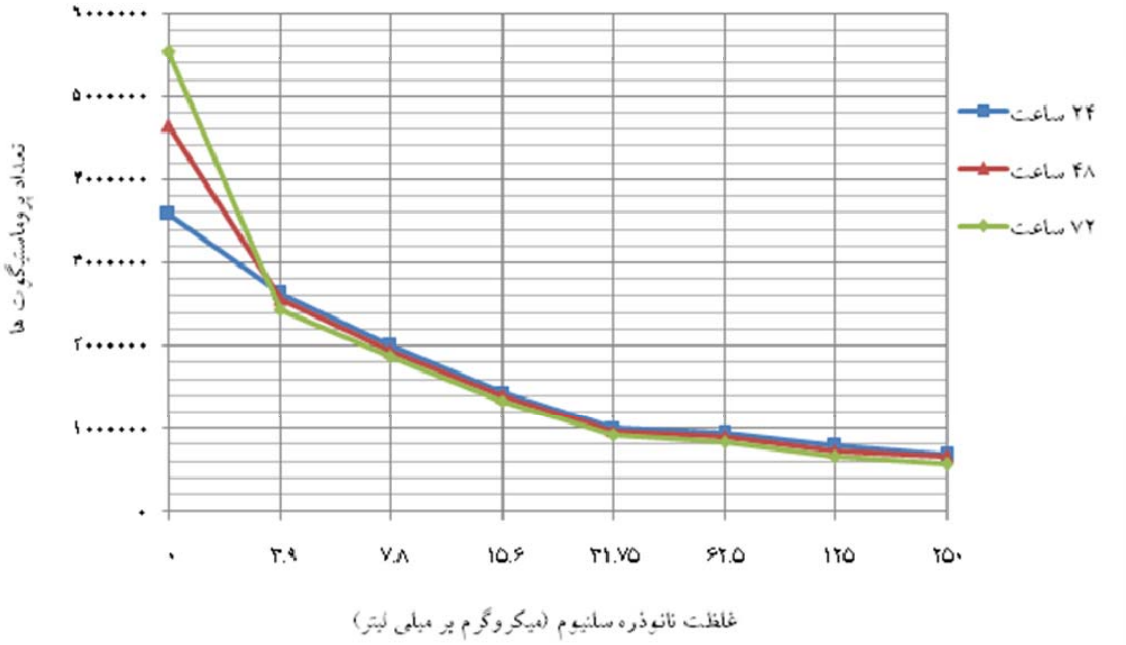
نتایج

میزان اثربخشی نانوذره سلنیوم بر اساس شمارش تعداد انگل پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت:

شمارش تعداد انگل نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات سلنیوم با گذشت زمان تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد و تعداد آنها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). با گذشت ۲۴ ساعت پس از کشت تعداد انگل در گروه کنترل $۳/۵۹\times۱۰^{۶}$ در هر میلی‌لیتر از محیط کشت بود که این تعداد در غلظت ۳/۹ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دارو به‌ترتیب $۲/۶۳\times۱۰^{۶}$ و $۰/۶۸\times۱۰^{۶}$ شمارش شد و با استفاده از نتایج شمارش انگل IC50 دارو ۲۴ ساعت پس از کشت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (نمودار شماره ۱).

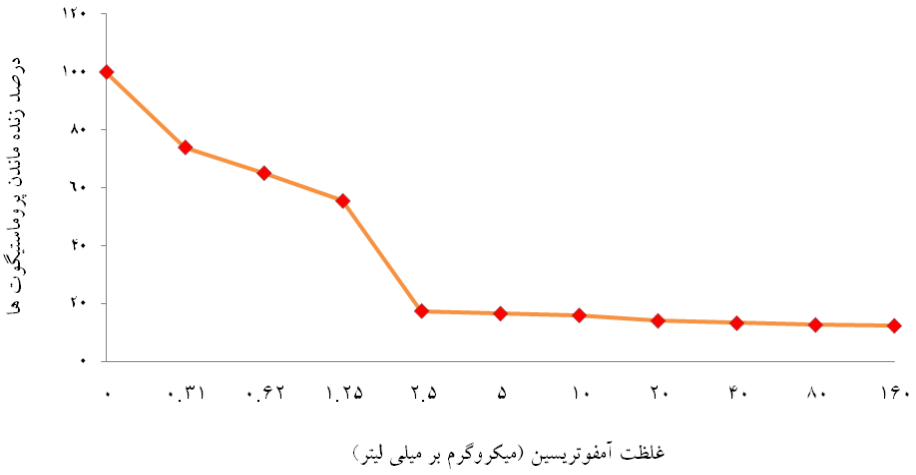
درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با آمفوتریسین ب بر اساس آزمایش MTT:

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های پس از ۳۰ دقیقه تیمار با آمفوتریسین ب با استفاده از روش MTT محاسبه شد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱- میانگین تعداد پروماستیگوت‌ها پس از مواجه شدن با غلظت‌های مختلف نانوذره سلنیوم ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت

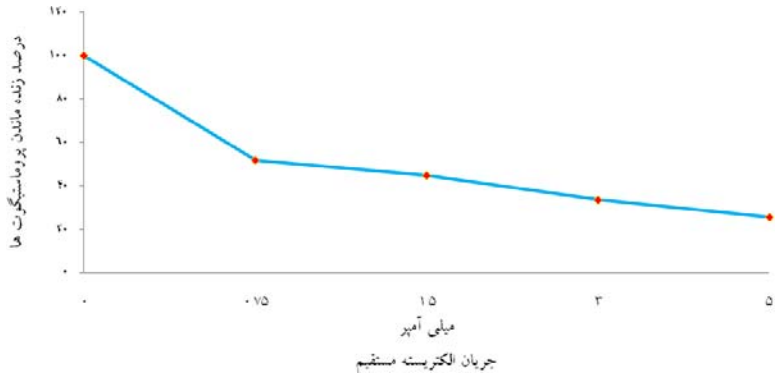
Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019



نمودار شماره ۲- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف آمفوتریسین ب پس از ۳۰ دقیقه

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با جریان مستقیم:

درصد پروماستیگوت‌های زنده پس از تیمار با آمپراژهای (۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۵) جریان‌های مستقیم به‌مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از روش MTT محاسبه شد. نتایج در نمودار شماره ۳ آمده است.



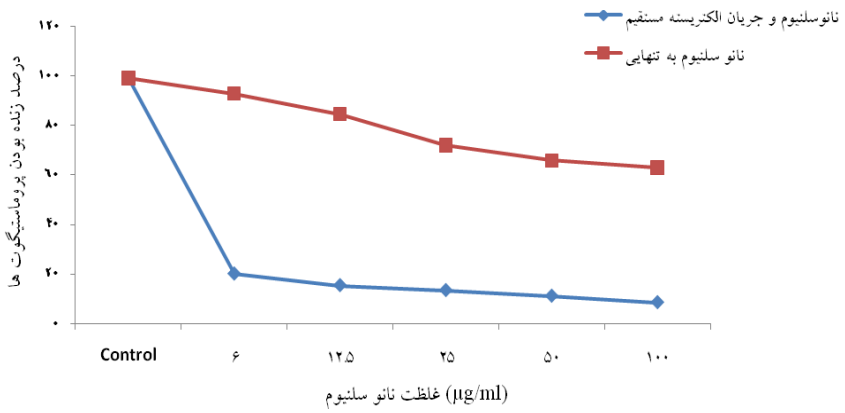
نمودار شماره ۳- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از مواجهه با جریان الکتریسته مستقیم

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با نانوذرات سلنیوم با غلظت‌های ۶، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۱۰ دقیقه پس از تیمار با استفاده از روش MTT محاسبه شد (نمودار شماره ۴).

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با جریان مستقیم و نانوذره سلنیوم:

درصد زنده بودن پروماستیگوت‌های تیمار شده با جریان مستقیم ۳ آمپر و نانوذره سلنیوم با غلظت‌های ۶، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ دقیقه پس از تیمار با استفاده از روش MTT محاسبه شد. نتایج در نمودار شماره ۴ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذره سلنیوم میزان کشندگی آن نیز افزایش می‌یابد؛ به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر در میلی‌متر پس از ۱۰ دقیقه مصرف آن همراه با القا ۳ میلی‌آمپر جریان مستقیم الکتریسیته ۹۱/۵ درصد پروماستیگوت‌ها از بین رفته‌اند. این در حالی است که مصرف این غلظت از نانوذره به‌تنهایی پس از ۱۰ دقیقه مواجهه با انگل، باعث مرگ‌ومیر فقط ۳۷/۱ درصد پروماستیگوت‌ها شده که این نشان از اثر هم‌افزایی مصرف نانوسلنیوم و الکتریسته در کشندگی پروماستیگوت‌ها است ($P<۰/۰۵$).

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019



نمودار شماره ۴- درصد زنده ماندن پروماستیگوت‌ها پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره سلنیوم به‌تنهایی و با جریان مستقیم ۳ میلی‌آمپر

بحث

خط اولیه درمان لیشمانیوز استفاده از ترکیبات آنتیموان می‌باشد، ولی این ترکیبات دارای عوارض جانبی است. علاوه بر این، مقاومت انگل نسبت به این ترکیبات و عود بیماری پس از درمان نیز وجود دارد. اگرچه زخم اغلب مشکل حادی برای بیمار ایجاد نمی‌کند و در اکثر موارد بهبودی خودبه‌خودی حاصل می‌شود، ولی به دلایل متعددی از جمله طولانی بودن دوره زخم، بد شکل بودن جوشگاه باقیمانده و احتمال عفونت‌های ثانویه در محل ضایعه ارائه روش درمانی آسان، قابل تحمل و بدون عوارض جانبی ضروری به‌نظر می‌رسد [۲۶]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نانوذرات سلنیوم در شرایط برون‌تنی باعث کاهش تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور می‌شود. مقایسه تعداد انگل در گروه کنترل با گروه‌های آزمایش در زمان‌های مختلف نشان داد که اثربخشی نانوذرات سلنیوم بر پروماستیگوت‌های انگل وابسته به غلظت و زمان می‌باشد. در سالیان اخیر از برخی نانوذرات از جمله طلا، سلنیوم، نقره و سولفید در درمان لیشمانیا استفاده شده است. در مطالعه سفلایی و همکاران که تاثیر ضد انگلی غلظت‌های مختلف آنتیموان سولفید تولید شده توسط باکتری *Serratia marcescens* بر لیشمانیا اینفانتوم در شرایط برون‌تنی ارزیابی شد، نتایج نشان داد که اثرات ضد انگلی این نانوذره وابسته به غلظت نانوذره می‌باشد و در غلظت ۱۰۰ میکرو-گرم بر میلی‌لیتر نانوذره درصد کشندگی بیشتر است. در ضمن IC50 نانوذره پس از ۷۲ ساعت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد [۲۱]. در یک مطالعه دیگر که کارایی غلظت‌های مختلف نانوذره سلنیوم، بر ضد لیشمانیوز احشایی ارزیابی گردید، نتایج نشان داد که تعداد پروماستیگوت‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد [۱۸]. در مطالعه بهشتی و همکاران [۱۹] که تاثیر غلظت-های مختلف سلنیوم بیوژنیک تولید شده توسط باکتری باسیلوس گونه MSH-1 بر روی لیشمانیا ماژور در شرایط درون و برون‌تنی ارزیابی شد، نتایج نشان داد که میزان کشندگی پس از ۷۲ ساعت بیش از ۴۸ ساعت بود و میزان IC_{50} پس از ۲۴ ساعت ۱/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان IC50 نانوذره سلنیوم پس از ۷۲ ساعت µg/mL ۴ بود و میزان کشندگی پس از ۷۲ ساعت بیشتر از ۴۸ ساعت بود. در مطالعه سفلایی و همکاران که فعالیت ضد لیشمانیایی سلنیوم و سلنیوم دی اکسید بر لیشمانیا اینفانتوم ارزیابی شد، نتایج نشان داد که غلظت µg/mL ۱۰۰ پس از ۷۲ ساعت بیشترین کشندگی را داشته و اثرات سایتوتوکسیک نانوذره سلنیوم بیشتر از سلنیوم دی اکسید است. هم‌چنین، میزان IC50 سلنیوم و سلنیوم دی اکسید پس از ۷۲ ساعت، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۱۸]. بنابراین می‌توان گفت که گرچه مکانیزم اثر سلنیوم ناشناخته است، ولی این نانوذره از دو طریق کاهش رشد و تکثیر، و کشتن انگل اثر می‌کند. هم‌چنان‌که Webster و Tran در مطالعه مکانیزم اثر سلنیوم بر استافیلو-کوکس اروئوس نیز به این نتجه دست یافتند. طبق گزارش آنها، سلنیوم قادر است که ۶۰ برابر نمونه شاهد رشد باکتری را کاهش و در عرض ۳-۵ ساعت ۴۰ درصد باکتری مذکور را بکشد [۲۸]. برای بهینه سازی الکتریسیته، جریان با آمپراژهای مختلف بر روی پروماستیگوت‌ها اعمال شد. نتایج آزمون MTT برای درصد انگل-های زنده در حضور جریان الکتریسیته مستقیم، ۱۰ دقیقه پس از اعمال جریان نشان داد که با افزایش جریان درصد کشندگی زیاد می‌شود و با اینکه جریان ۵ میلی‌آمپر بیشترین درصد کشندگی را به‌خود اختصاص داده بود، ولی به‌علت اینکه برای رسیدن به جریان ۵ میلی‌آمپر ولتاژ به ۳۵ ولت می‌رسید، در نتیجه از جریان ۳ میلی‌آمپر استفاده شد. برای گروه جریان الکتریسیته برای نانوذرات

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019

سلنیوم هم بهینه‌سازی صورت گرفت. بدین صورت که یک غلظت پایین‌تر و دو غلظت بالاتر از IC50 در گروه‌های جریان الکتریسیته و نانوذره و نیز نانوذره به‌تنهایی آزمایش شد. در گروه‌های جریان الکتریسیته به‌همراه نانوذره ۱۰ دقیقه پس از اعمال جریان جریان مستقیم و نانوذره، بیشترین درصد کشندگی را داشتند. در مطالعه حجازی و همکاران [۱۶] که تاثیر جریان مستقیم بر کشندگی لیشمانیا ماژور را ارزیابی کردند، نتایج نشان داد که هرچه فاصله الکترودها به‌هم نزدیک می‌شود، میزان کشندگی بیشتر می‌شود. نتایج نشان داد که کشته شدن انگل‌ها با فاصله الکترودها وابستگی شدید دارد؛ به‌طوری‌که فاصله ۵ سانتی‌متری بین دو الکترود و اعمال ولتاژهای مربوطه هیچ تاثیری در حیات انگل‌ها ایجاد نکرد، ولی کم کردن تدریجی فاصله دو الکترود تا حد ۲ سانتی‌متر در ولتاژهای ۶ و ۹ و ۱۲ موجب مرگ انگل‌ها در مدت زمان کمتر از ۱۰ دقیقه گردید و ولتاژ ۳ دریافتی از منبع تغذیه در مدت زمان ۳۵ دقیقه باعث کشته شدن کامل انگل‌ها شد؛ البته با این تفاوت که ولتاژهای ۳ و ۹ و ۱۲ دریافتی از منبع تغذیه باعث تخریب کامل سلول‌های انگلی شد، ولی ولتاژ ۳ دریافتی از منبع تغذیه، صرفا باعث کشته شدن و بی‌تحرک شدن انگل می‌شود. هم‌چنین، تاثیر الکتریسیته روی هر دو فاز یکسان بود. در مطالعه حجازی و همکاران ولتاژ متغیر بوده، ولی در مطالعه ما جریان متغیر است. در مطالعه ما پس از بهینه سازی جریان، جریان ۳ میلی‌آمپر به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌عنوان جریان مناسب برای شرایط برون‌تنی استفاده شد. شواهد و مدارک زیادی نیز وجود دارد که جریان الکتریکی می‌تواند رشد باکتری‌ها را مهار کند. Rowley و همکاران نشان داده‌اند که *Pseudomonas aeruginosa* در زخم خرگوش با اعمال جریان مستقیم با قطبیت منفی مهار می‌شود [۲۹]. Barrunco و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که جریان مستقیم قادر به مهار رشد *S. aureus* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد [۳۰]. Szuminsky و همکاران نیز نشان داده‌اند که ولتاژهای ضربه‌ای با دامنه زیاد در شرایط برون‌تنی باعث مهار رشد *E .coli, Klebsiella, S. aureus* می‌گردد [۱۴]. از طرفی لیشمانیا در pH خنثی دارای شارژ منفی و دارای رفتار الکتریکی مشابه با باکتری‌ها می‌باشد [۳۱]. لذا انتظار می‌رفت که الکتریسته اثری مشابه باکتری‌ها بر لیشمانیا اعمال نماید و نتایج مطالعه حاضر موید این تاثیر است؛ گرچه در مورد مکانیزم این تاثیر هنوز سندی منتشر نشده است.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد گرچه استفاده از نانوذره سلنیوم سبب کشتن کامل پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور نمی‌گردد، ولی مصرف توام جریان مستقیم الکتریسیته و نانوذرات سلنیوم اثر هم‌افزایی قابل توجهی در کشندگی پروماستیگوت‌ها دارد. مزیت استفاده از نانوسلنیوم و جریان الکتریسته مستقیم این است که هردو نسبت به نانوذرات دیگر مانند طلا و نقره و هم‌چنین داروها ارزان‌تر و بی‌خطرتر هستند. لذا، انجام مطالعات بیشتر در این زمینه می‌تواند افق‌های روشن‌تری را برای درمان لیشمانیوز فراهم سازد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با حمایت مالی دانشگاه مذکور انجام شده است. بدین‌وسیله، از کلیه همکاران محترم گروه و معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References:

[1] Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007.

[2] Saebi A, Parasitic diseases in Iran, protozoan diseases. Printing and Publishing Organization Amozesh Islamic Revolution; 2003. p. 185- 205. [in Persian]

[3] Das N, Mahota SB, Naskar K, Ghosh DK, Basu MK. Targeting of urea stibamine encapsulated in liposomes to reticuloendothelial system for the treatment of experimental leishmaniasis. ***Biochem Med Metab Biol*** 1990; 43(2): 133-9.

[4] Grogl M, Thomasen TN, Franke ED. Drug-resistance in leishmaniasis: Its cutaneous and mucocutaneous disease. ***AM J Trop Hyg*** 1992; 47(1): 117-26.

[5] Hebburn NC, Tidman MJ, Hunter JA. Aminosidine (Paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. ***Trans R Soc Trop Med Hyg***1994; 88: 700-3.

[6] Rashid JR, Wasunna KM, Gachichi GS, Nyakundi PM, Mbugua J, Kirigi G. The efficacy and safety of Ketoconazole in visceral leishmaniasis. ***East Afr Med J*** 1994; 71(6): 392-5.

[7] Abahusein A, Larbi EB, Khawajeh A, Gindan Y, Jain S. Evaluation of topical Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. ***East Afr Med J*** 1992; 69(1): 1417.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 8:21 +0430 on Thursday June 20th 2019

[8] Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2001; 45(8): 2185-97.

[9] Murray HW, Hariprashad J, Fichtl RE. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine. ***Antimicrob Agents Chemother*** 1993; 37(7): 1504-5.

[10] Brogden RN, Goa KL, Coukell AJ. Amphotericin B Colloidal dispersion. ***Drugs*** 1998; 56(3): 365-83.

[11] Mullen AB, Baillie AS, Carter KC. Visceral leishmaniasis in the Balb/c mice. ***Antimicrob Agents Chemother*** 1998; 42(10): 2722-5.

[12] Moore EM, Lockwood DN. Treatment of visceral leishmaniasis. ***J Glob Infect Dis*** 2010; 2(2): 151-8.

[13] Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Horwith GS, Murray HW. Short – course, low dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. ***Ann Intern Med*** 1997; 127(2): 133-7.

[14] Szuminsky NJ, Albers, AC, Unger, P, Eddy, JG. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. ***Phys Ther*** 1994; 74(7): 660–7.

[15] Gentzkow GD, Pollack SV, Kloth LC, Stubbs HA. Improved healing of pressure ulcers using derma pulse, a new electrical stimulation device. ***Wounds*** 1991; 3(5): 158-70.

[16] Hejazi H, Eslami G, Dalimi A. The parasiticidal effect of electricity on *Leishmania major*, both in vitro and in vivo. ***Ann Trop Med Parasitol*** 2004; 98(1): 37-42.

[17] Sharquie KE, Al-Hamamy H, el-Yassin D, Treatment of cutaneous leishmaniasis by direct current electrotherapy: The Baghdadin device. ***J Dermatol*** 1998; 25(4): 234–7.

[18] Soflaei S, Dalimi A, Abdoli A, Kamali M, Nasiri V, Shakibaie M, et al. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on Leishmania infantum. ***Comp Clin Pathol*** 2014; 23(1): 15-20.

[19] Beheshti N, Soflaei S, Shakibaie M, Yazdi MH, Ghaffarifar F, Dalimi A, et al. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major* In vitro and in vivo studies. ***J Trace Elem Med Biol*** 2013; 27(3): 203–7.

[20] Baiocco P, Ilari A, Ceci P, Orsini S, Gramiccia M, Di Muccio T, et al. Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. ***ACS Med Chem Lett*** 2011; 2(3): 230–3.

[21] Soflaei S, Dalimi A, Ghaffarifar F, Shakibaie M, Shahverdi AR, Shafiepour M. In vitro antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on *Leishmania infantum*. ***J Parasitol Res*** 2012; 2012: 756568.

[22] Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. ***Int J Nanomedicine*** 2011; 6: 2705–14.

[23] Elmi T, Gholami Sh, Fakhar M, Azizi F. A review on the use of nanoparticles in the treatment of parasitic infections. ***J Mazand Univ Med Sci*** 2013; 23(102); 127-34. [in Persian]

[24] Jebali A, Kazemi B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. ***Toxicol In Vitro*** 2013; 27(6): 1896-904.

[25] Torabi N, Mohebali M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Edrissian Gh, Esmaeili J, Charehdar S. Nanogold for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): An animal trial with methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis*. ***J Pharm Health Sci*** 2011; 1(1): 13-16.

[26] Delavari M, Dalimi A, Ghafarifar F, Sadraei J. In vitro study on cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). ***Iran J Parasitol*** 2014; 9(1): 6-13.

[27] Andreadou M, Liandris E, Gazouli M, Taka S, Antoniou M, Theodoropoulos G, et al. A novel non-amplification assay for the detection of *Leishmania* spp. In clinical samples using gold nanoparticles. ***J Microbiol Methods*** 2014; 96: (56-61).

[28] Tran Ph, Webster TJ. Selenium nanoparticles inhibit Staphylococcus aureus growth. ***Int J Nanomedicine*** 2011; 6: 1553–8.

[29] Rowley BA, McKenna JM, Chase GR, Wolcott LE. The influence of electrical current an infecting microorganism in wounds. ***Ann NY Aced Sci*** 1974; 238: 543-52.

[30] Barranco SD, Spadro JA, berfer TJ, Becker RO, In Vitro effect of weak direct current on staphylococcus aureus. ***Clin Orthop Relat Res*** 1974; (100): 250-5.

[31] Salle AJ. The Electrical Behavior of Leishmania Donovani. ***J Infect Dis*** 1931; 49(5): 367-98.