مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۹. شماره ۳. پاییز ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی میزان سمیت و اثر ضد انگلی گیاه اناریجه (Froriepia subpinnata) برروی مرحله پروتواسکولکس انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در شرایط برون‌تنی

بهمن رحیمی اسبویی[۱]، آیت الله نصرالهی عمران[۱]، آرونا چابرا[۲]، زهرا اسدالهی[۳]، پیمان حیدریان[۴*]

۱. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران
۲.گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
۳.گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴.گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

چکیده

زمینه و هدف: هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماری‌های انگلی و شایع در ایران است. تاکنون درمان مشخص و مطمئنی برای این بیماری ثبت نشده است، این مطالعه با هدف بررسی اثر ضدانگلی گیاه اناریجه بر روی مرحله پروتواسکولکس انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در شرایط برون‌تنی انجام شد.

روش‌ها: گیاه اناریجه از مناطق جنگلی استان‌مازندران جمع آوری و با استفاده از روش ماسیراسیون و الکل متانول عصاره‌گیری انجام و عصاره‌ها در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. پروتواسکولکس انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس از کبد، طحال و ریه گوسفندی جدا شد. غلظت‌های مختلف داروئی در کنار داروی آلبندازول بعنوان کنترل مثبت در پلیت‌های ۹۶ خانه به همراه پروتواسکولکس‌ها به مدت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه و در نهایت میزان زنده‌مانی انگل با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین ۰/۰۱ بررسی شد.

نتایج: برطبق یافته‌ها، با افزایش غلظت‌دارو و افزایش‌زمان انکوباسیون میزان زنده‌مانی پروتواسکولکس‌ها بطور معنی‌داری کاهش می‌یابند. غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر از عصاره متانولی گیاه بعنوان مناسبترین دوز مصرفی بود که بعد از ۴۸ ساعت ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌ها را از بین‌برد. همچنین نتایج تست MTT نشان داد که عصاره متانولی گیاه حتی در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچگونه سمیتی بر روی رده سلولی HeLa نداشته است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌داد که گیاه اناریجه دارای خاصیت اسکولکس‌کشی مناسب می‌باشد و پس از انجام آزمایشات تکمیلی و تائیدی می‌تواند بعنوان درمان طبیعی ضدانگلی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها:
اناریجه، اکینوکوکوس گرانولوس، کیست هیداتیک، پروتواسکولکس

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

*آدرس نویسنده مسئول: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
ایمیل: p.heydarian86@gmail.com, p.heydarian@qums.ac.ir تلفن:028 33336000

مقدمه

اکینوکوکوزیس یا بیماری کیست‌هیداتیک یکی از مهمترین و قدیمی‌ترین بیماری‌های‌انگلی زئونوز و مشترک بین انسان و علفخواران می باشد که توسط مرحله لاروی کرم اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. این بیماری در اکثر نقاط دنیا دیده می‌شود و جوامع درگیر را از نظر بهداشتی و اقتصادی محتمل خسارات زیادی می‌کند(۱, ۲).

سگ و سگسانان میزبان نهایی انگل محسوب شده و انسان به عنوان میزبان تصادفی، طی خوردن آب، سبزیجات و مواد غذایی آلوده به تخم‌انگل، مبتلا می شود. اگرچه فرم بالغ انگل در میزبان‌اصلی، تهدید کننده‌ی حیات نیست، اما لارو آن در میزبان واسط با ایجاد کیست در بافت‌های مختلف ازجمله کبد،ریه، مغز میتواند موجب بیماری شدید و حتی‌مرگ شود(۳, ٤).

بیشترین موارد کیست‌هیداتیک در کبد،ریه و طحال ایجاد می شود ولی در دیگر اندام‌ها مانند استخوان، کلیه، طحال، ماهیچه ها، اعصاب مرکزی و چشم هم کیست ایجاد می شود(٥). کم‌اشتهایی و ضعف از علائم عمومی این بیماری است و دل درد، تهوع و استفراغ از علائم شایع ایجاد کیست‌هیداتید در کبد می باشد. در صورت بروز بیماری در ریه، سرفه مزمن، درد سینه و تنگی نفس از علائم خواهند بود(٦). تشخیص اکینوکوکوزیس بر اساس معاینه، علائم بالینی، شرح حال بیمار و سونوگرافی بافت آسیب‌دیده صورت می‌گیرد. البته برای تائیدبیماری، از روش های سی‌تی‌اسکن (CT scan) وتصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI: Magnetic resonance imaging) هم استفاده میشود و روش آزمایشگاهی تشخیص این بیماری براساس وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه کیست هیداتید در سرم بیمار به کمک روش ایمنوفلوئورسنس غیرمستقیم است(۷).

درمان کیست‌هیداتیک در انسان باتوجه به عدم تاثیر قطعی دارو ها از قبیل ترکیبات بنزیمیدازول ها مانند آلبندازول و مبندازول اغلب بعنوان پروفیلاکسی به‌کاربرده می‌شوند و معمولا پس از عمل جراحی جهت جلوگیری از انتشار و رشد کیست استفاده می‌شود(۸). تاکنون داروی‌موثر و قطعی برای درمان کیست‌هیداتیک ارائه نشده است و تنها راه درمان و نجات بیماران، عمل جراحی می‌باشد که در سال‌های اخیر از روش هایی بنام (Puncture Aspiration Injection Re-aspiration: PAIR) استفاده می‌شود که باز هم روش قطعی نبوده و نیاز به مهارت و دقت خاص دارد(۹).

درمان، یکی از مشکلات اساسی بهداشتی سازمان بهداشت جهانی در ارتباط با کیست‌هیداتیک می باشد. یافتن داروهای جدید با اثرات ضدانگلی مناسب به منظور از بین بردن و جلوگیری از گسترش انگل در بدن همواره مد نظر محققان حوزه پزشکی و درمان بوده است(۱۰-۱۲). با توجه به اینکه در سال‌های اخیر تمایل به استفاده از داروهای گیاهی و ترکیبات طبیعی در سراسر دنیا رو به افزایش است و همچنین بعلت وجود تنوع گیاهان داروئی در کشورما، دسترسی مناسب، عدم وجود عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی و پذیرش بهتر بیماران، این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد انگلی عصاره متانولی گیاه اناریجه(Froriepia subpinnata) بر روی مرحله لاروی انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس طراحی و اجرا گردید.

روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

در این مطالعه ۵۰۰ گرم از قسمت‌های هوایی گیاه از مناطق جنگلی در استان مازندران جمع‌آوری و پس از تهیه هرباریوم گیاه، جنس و گونه گیاه توسط متخصصان بخش فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی استان مازندران مورد تائید قرار گرفت. گیاه در محیط خشک و تاریک و به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شد و سپس آسیاب و به صورت پودر درآمد. پودر به دست آمده از الک با مش ٤٠ گذرانده و در بالن ۲ لیتری ریخته و به آن ۱۵۰۰ میلی لیتر متانول افزوده شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکر دار در درمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرارگرفت. پس از این مرحله، تفاله‌های گیاهی بوسیله کاغذ واتمن شماره ۱

جدا شد و محلول توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء تغلیظ گردیدند و جهت حذف کامل حلال، کلیه عصاره‌ها با خشک‌کن انجمادی، خشک و به پودرتبدیل شدند. پودر حاصل برای آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸درجه سانتیگراد نگهداری شدند(۱۳).

جداسازی پروتواسکولکس انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس

کبد و ریه گوسفندان آلوده به کیست‌هیداتید از کشتارگاه شهرستان ساری از استان مازندران جمع‌آوری و به همراه کیسه‌های یخی بلافاصله به آزمایشگاه انگل‌شناسی منتقل گردید. پس از شستشوی سطح کیست با الکل ۷۰ ٪، مایع‌هیداتید درون کیست که حاوی پروتواسکولکس بود را به وسیله‌ی یک سرنگ‌استریل ۵۰ سی سی آسپیره کرده و طی چند مرحله با استفاده از محلول نرمال‌سالین (pH=7.2) و جنتامایسین (۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر) شستشو داده شد. میزان زنده بودن پروتواسکولکس‌ها با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین ۰/۱ ٪ بررسی شد و نمونه هایی که بیش از ۹۰ ٪ زنده بودند، جهت انجام مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند(۱۴).

بررسی اثر ضد انگلی عصاره متانولی گیاه اناریجه

در این مطالعه عصاره‌گیاهی در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تهیه شد. و برای بررسی عصاره گیاهی از پلیت های ۲۴ خانه ایی استفاده شد. به هر چاهک مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آسپیره شده مایع کیست حاوی تقریبا ۱×۱۰^{۴} عدد پروتواسکولکس اضافه شد و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده به هر چاهک اضافه شدند. پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، دی اکسید کربن(Co_2) ۵ درصد و رطوبت ۹۰ ٪ انکوبه شدند و بعد از گذشت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، پلیت‌ها خارج و از هر چاهک یک اسمیر تهیه شد و با استفاده از رنگ‌حیاتی ائوزین ۰/۱ ٪ میزان زنده مانی پروتواسکولکس‌ها را مورد ارزیابی قرارگرفت. بطوری که رنگ حیاتی وارد پروتواسکولکس‌های زنده نمی‌شود و این سلول ها به رنگ سفید یا بی‌رنگ بودندپروتواسکولکس‌های مرده رنگ قرمز ائوزین را به خود گرفتند(۱۵).

بررسی سایتو توکسیسیتی عصاره متانولی گیاه اناریجه

رده سلول HeLa در محیط کشت RPMI-1640 حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ ٪ و جنتامایسین ۱ ٪ (۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر) جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها کشت داده شدند. سپس در انکوباتور ۳۷ درجه در حضور دی اکسید کربن(Co2) ۵ ٪ و رطوبت ۹۵ ٪ کشت داده‌شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول‌زنده در میکروپلیت های ۹۶ خانه کشت داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه در غلظت های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ تترازولیوم به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۲ ساعت، محلول تترازولیوم از چاهک خارج شده و ۱۰۰ میکرو لیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۲۰ دقیقه شیک شد و نهایتا میزان بقای سلولی در دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید(۱۶).

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون های آماری آنوا (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان IC50 با استفاده از نرم افزار Graphpad PRISM ارزیابی شد.

نتایج

در این مطالعه میزان زنده مانی پروتواسکولکس‌های انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در اثر مجاورت با عصاره متانولی گیاه اناریجه در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بعد از ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط برون‌تنی مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی مراحل انجام آزمایش در سه‌بار تکرار شده است. در جدول شماره ۱ میزان اثر ضد انگلی گیاه اناریجه نشان داده شده است. براین اساس میزان اثرضد انگلی گیاه اناریجه با افزایش غلظت و زمان اثر، افزایش می یابد. در این مطالعه همچنین از داروی آلبندازول در غلظت

۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بعنوان گروه کنترل استفاده شد که میزان اثر آن با اختلاف معنی داری بهتر از غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بوده است (p=۰/۰۰۳). در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر میزان اثر ضدانگلی آلبندازول از گیاه اناریجه در همین غلظت بهتر بود، اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۰۸٤)

میزان اثربخشی عصاره اناریجه در غلظت های ٤۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بهتر از آلبندازول بود با این تفاوت که اختلاف اثر آلبندازول با غلظت ٤۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/٦۳) در صورتی‌که با غلظت ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر اثر معنی‌داری داشت (p=۰/۰۱٦)

جدول ۱: میزان اثر عصاره متانولی گیاه اناریجه بر روی زنده‌مانی پروتواسکولکس‌های انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس برحسب غلظت‌های مختلف دارو و شرایط زمانی متفاوت

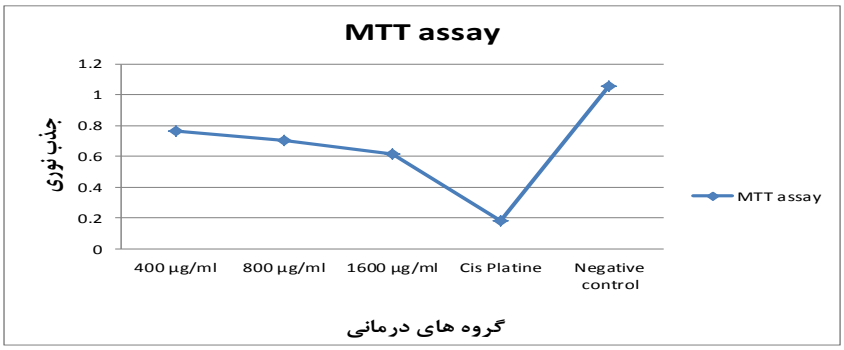
میزان زنده مانی (٪)	تعداد تست	زمان (ساعت)				P-value*
غلظت دارو (میکرو گرم بر میلی لیتر)		۶	۱۲	۲۴	۴۸	
۵۰	۱	۸٦	٦۷	٤۳	۲۱	۰/۰۰۱
	۲	٦۷	۷٦	۳۷	۱۸	
	۳	۷۹	٦٤	٤۱	۱۷	
میانگین		۷۷/۳۳	٦۹	٤۰/۳۳	۱۸/٦٦	
۱۰۰	۱	٥٦	٥۱	۳۱	۱۱	۰/۰۰۱
	۲	٦۰	٤٥	۲٦	۷	
	۳	٥۸	٤۹	۱۱	۰	
میانگین		٥۸	٤۸/۳۳	۲۲/٦٦	٦	
۲۰۰	۱	٤٥	۲٦	۹	۰	۰/۰۰۱
	۲	٥۱	۳۱	۱۳	۰	
	۳	٤۷	۲۳	۰	۰	
میانگین		٤۷/٦٦	۲٦/٦٦	۷/۳۳	۰	
۴۰۰	۱	٤۲	۱۲	۰	۰	۰/۰۰۱
	۲	٤۱	۹	۰	۰	
	۳	٤٦	۰	۰	۰	
میانگین		٤۳	۷	۰	۰	
۸۰۰	۱	٤٤	۰	۰	۰	۰/۰۰۱
	۲	۳۱	۰	۰	۰	
	۳	٤۳	۰	۰	۰	
میانگین		۳۹/۳۳	۰	۰	۰	
آلبندازول (۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)	۱	٥۲	۱٥	۳	۰	
	۲	٤۹	۷	۰	۰	
	۳	٤٦	۱۳	۰	۰	
میانگین		٤۹	۱۱/٦٦	۱	۰	

کنترل منفی (بدون دارو)	۱	۹٤	۹۱	۷۷	٦٥	
	۲	۹٥	۸۷	۸٤	٦۹	
	۳	۹۱	۸٥	۸۳	٥۸	
میانگین		۹۳/۳۳	۸۷/٦٦	۸۱/۳۳	٦٤	
سطح معنی داری		۰/۰۰۱				

* Student's t-*test* و one-way ANOVA

همچنین در این مطالعه علاوه بر بررسی اثرات ضد انگلی، میزان سمیت غلظت های ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی گیاه در مقایسه با داروی سیس پلاتین بعنوان کنترل مثبت و گروه بدون درمان بعنوان کنترل منفی با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرارگرفت.

با توجه به شکل ۱، نتایج نشان می دهد که سمیت ناشی از عصاره متانولی گیاه اناریجه در بالاترین غلظت مورد استفاده (۱٦۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) کمتر از داروی سیس پلاتین بوده و این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار می باشد (p=۰/۰۰۱)



شکل ۱: بررسی میزان سمیت عصاره متانولی گیاه اناریجه و میانگین جذب نوری بدست آمده از تست MTT بر روی سلول های HeLa

بحث

بیشترین داروهایی که در درمان اکینوکوکوزیس مورد استفاده قرار می‌گیرند، داروهای خانواده بنزیمیدازول‌ها هستند که باتوجه به حلالیت کم این داروها در آب و جذب ضعیف برخی از این داروها از دستگاه گوارش موجب کاهش اثربخشی این داروها شده است. علاوه بر این لکوپنی، پروتئین اوری، آسیب کبدی، افزایش ترانس آمینازها، اختلالات گوارشی، ریزش مو سمیت دارو برای جنین به خصوص در اوایل بارداری نیز از عوارض جانبی این داروها می باشد(۱۷). بنابراین جستجو برای داروهای موثرتر و بدون عوارض جانبی برای درمان کیست‌هیداتیک از اهمیت زیادی برخورداراست. در این مطالعه میزان زنده‌مانی پروتواسکولکس‌های انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در اثر مجاورت با عصاره متانولی گیاه اناریجه مورد ارزیابی قرارگرفت.برطبق یافته‌ها، اناریجه از گیاهان بومی استان‌های شمالی (گیلان، مازندران و گلستان) کشورما می باشد که بصورت خوراکی مصرف می شود. نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی نشان داد که هیدروکربن‌های مونوترپن شامل لیمونن، ترپینولن و فلاونوئیدهااز فراوانترین ترکیب شناسایی شده در اسانس اناریجه می‌باشند. همچنین ترکیبات فنلی مانند اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، کینونها، کومارین ها، لیگنانها، استیلبنها، تاننها ترکیبات نیتروژنی آلکالوئیدها، آمینها، بتالائینها ویتامینهای E و C نیز در این گیاه وجود دارد(۱۸).

اثرات ضد میکروبی متعددی از گیاه اناریجه گزارش شده است و مطالعات مختلف نشان داده‌اند که گیاه اناریجه میتواند بعنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی مورد استفاده قرار گیرد(۱۹, ۲۰). هودا

(Huda) و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گیاه اناریجه را بر روی باکتری های گرم مثبت مانند باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوک اورئوس، باکتری‌های گرم منفی مانند اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا و قارچ های آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قراردادند و نتایج مطالعه آنها نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی و متانولی اثر متوسط بر روی باکتری استافیلوکوک اورئوس و اثر قوی بر روی باسیلوس سوبتیلیس دارند، عصاره کلروفرمی و متانولی بهترین اثر را روی باکتری های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنمونیه دارند، عصاره اتیل استاتی و متانولی بهترین اثر را روی سودوموناس آئروژینوزا داشته اند و از بین عصاره های مورد بررسی، بهترین اثر ضد قارچی بر علیه آسپرژیلوس‌نایجر و کاندیدا آلبیکنز مربوط به عصاره اتیل استاتی و متانولی بوده است(۲۱). با وجود بررسی اثرات ضد میکروبی و ضدقارچی متعددی که انجام گرفته است، ولی مطالعات محدودی در زمینه بررسی اثرات ضدانگلی از این گیاه صورت پذیرفت. بعنوان مثال نیتی (Niyyati) و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر ضد تریکومونایی این گیاه را بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس مورد بررسی قرار دادند و نتایج بررسی آنان نشان داد که گیاه اناریجه در غلظت ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بعد از گذشت ۲٤ و ٤۸ ساعت توانسته است که بترتیب ۷۳/۷ و ۸٦/۹٪ از تروفوزوئیت‌های انگل تریکوموناس واژینالیس را از بین ببرد(۲۲).

در مطالعه حاضر اثر ضد انگلی گیاه اناریجه در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بر روی مرحله لاروی انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس ارزیابی‌گردید و نتایج نشان داد که عصاره متانولی این‌گیاه در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر و غلظت های بالاتر موجب مرگ بیش از ۵۰ درصد پروتواسکولکس ها شده اند و در غلظت های ٤۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر حتی اثرات بهتر از داروی آلبندازول داشته اند که بعنوان داروی اصلی و متداول این بیماری می‌باشد.

در مطالعات مختلف، اثرات ضد انگلی گیاهان و ترکیبات متعددی را مورد بررسی قرار دادند. بعنوان نمونه جلالی و همکاران در سال ۱۳۹٤ تأثیر آلبندازول، اکیناسه پورپوره آ، آقطی و نانوذرات اکسید روی بر کیست هیداتیک تک حفره ای در موش کوچک آزمایشگاهی را مورد بررسی قراردادند و نتایج نشان داد که تعداد، اندازه و حجم کیستها در گروه‌های درمان شده در مقایسه با گروه شاهد آلوده کاهش معنی‌داری داشت. کم ترین تعداد کیست در گروه درمانی اکیناسه و کم ترین اندازه و حجم کیست در گروه تحت درمان با آقطی مشاهده شد. بیشترین تعداد، حجم و اندازه کیست در گروه شاهد آلوده مشاهده گردید. بررسی اثر درمانی آقطی، اکیناسه و نانواکسید روی در غلظت ٤۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن در مطالعه ی حاضر مؤید اثرات کاهشی مشخص در تعداد، اندازه و حجم کیست بود(۲۳) که در مقایسه با مطالعه حاضر از غلظت داروئی بسیار بالاتری استفاده شده است. در مطالعه دیگر موذنی و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی اثرات پروتواسکولکس کشی اسانس میوه گیاه زنیان (Trachyspermum ammi) پرداختند. پروتواسکولکس ها با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر اسانس گیاه زنیان به مدت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٦۰ دقیقه مواجه شده اند. میزان ۱۰۰ ٪ پروتواسکولکس ها پس از این که به مدت ۱۰ دقیقه در معرض‌غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر اسانس زنیان قرار گرفتند، از بین رفتند. نتایج مطالعه‌ی فوق روشن ساخت که قدرت پروتواسکولکس کشی گیاه زنیان بالا است و می تواند به عنوان یک اسکلوسیدال طبیعی استفاده شود(۲٤). در بررسی اثرات عصاره ی میوه ی گیاه مالاتوس فیلیپینی (Mallotus philippinensis) مشخص شد که غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره بعد از مدت زمان ٦۰ دقیقه به ترتیب سبب از بین رفتن پروتواسکولکس ها به میزان۹۷ و ۹۸ درصد شد. غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره در زمان بیش از ۲ ساعت باعث از بین رفتن کامل پروتواسکولکس ها گردید(۲۵).

در مطالعه حاضر بالاترین غلظت مورد بررسی، غلظت ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بود که نسبت به مطالعات بالا بسیار

کمتر بوده است. همچنین نتایج نشان داد که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ٤٨ ساعت، غلظت ٤٠٠ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ٢٤ ساعت و غلظت ٨٠٠ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ١٢ ساعت موجب مرگ ١٠٠ درصدی پروتواسکولکس های انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس شده‌است که در مقایسه با نتایج حاصل از سایر مطالعات اثرات قابل قبولی دارد. علاوه بر بررسی اثر ضد انگلی، در این مطالعه میزان سمیت این گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از روش MTT نشان داده است که عصاره متانولی گیاه اناریجه حتی در غلظت ١٦٠٠ میکرو گرم بر میلی لیتر نیز فاقد سمیت می باشد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج، عصاره متانولی گیاه اناریجه در غلظت های ٢٠٠، ٤٠٠ و ٨٠٠ میکرو گرم بر میلی لیتر دارای اثرضد انگلی قوی بر روی پروتواسکولکس های انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در شرایط برون‌تنی دارد و میتواند پس از انجام مطالعات تکمیلی در فاز های درون‌تنی و فاز انسانی, بعنوان ترکیب طبیعی ضد انگلی برای درمان بیماری کیست‌هیداتیک مورد استفاده قرار گیرد. بهترین غلظت و زمان برای این گیاه، غلظت ٢٠٠ میکرو گرم بر میلی لیتر بعد از ٤٨ ساعت می باشد که بعنوان دوز موثر دارو در نظر گرفته شده است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کلیه شرکت کنندگان در این پژوهش که با سعه‌صدر، همکاری نمودند و ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری‌دادند، اعلام نمایند. این مقاله منتج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد با کد ٢٩/٢/٤٦٥٢ و شناسه اخلاق IR.QUMS.REC.1400.328 در دانشگاه علوم پزشکی قزوین مورد تایید قرار گرفت.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها :بهمن رحیمی اسبویی،آیت الله نصرالهی عمران، آرونا چابرا

(۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: بهمن رحیمی اسبویی، زهرا اسدالهی، پیمان حیدریان

(۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: بهمن رحیمی اسبویی، پیمان حیدریان

References

1. Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, et al. Echinococcosis: advances in the 21st century. Clinical microbiology reviews. 2019;32(2):e00075-18.

2. Zeinali M, Mohebali M, Shirzadi MR, Esboei BR, Erfani H, Pourmozafari J, et al. Human cystic Echinococcosis in different geographical zones of Iran: an observational study during 1995–2014. Iranian journal of public health. 2017;46(12):1623.

3. Larrieu E, Gavidia CM, Lightowlers MW. Control of cystic echinococcosis: background and prospects . Zoonoses and public health. 2019;66(8):889-99.

4. Hezarjaribi HZ, Fakhar M, Esboei BR, Soosaraei M, Ghorbani A, Nabyan N, et al. Serological evidence of human cystic echinococcosis and associated risk factors among general population in Mazandaran Province, northern Iran. Annals of medicine and surgery. 2017;18:1-5.

5. Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. Emerging infectious diseases. 2006;12(2):296.

6. Mahmoudi S, Mamishi S, Banar M, Pourakbari B, Keshavarz H. Epidemiology of echinococcosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. BMC infectious diseases. 2019;19(1):1-19.

7. Brunetti E, Tamarozzi F, Macpherson C, Filice C, Piontek MS, Kabaalioglu A, et al. Ultrasound and cystic echinococcosis. Ultrasound international open. 2018;4(03):E70-E8.

8. Velasco-Tirado V, Alonso-Sardón M, Lopez-Bernus A, Romero-Alegría Á, Burguillo FJ, Muro A, et al. Medical treatment of cystic echinococcosis: systematic review and meta-analysis. BMC infectious disease2018;18 (1)1-19.

9. Salm L, Lachenmayer A, Perrodin S, Candinas D, Beldi G. Surgical treatment strategies for hepatic alveolar echinococcosis. Food and waterborne parasitology. 2019;15:e00050.

10. Rahimi-Esboei B, Fakhar M, Chabra A, Hosseini M. In vitro treatments of Echinococcus granulosus with fungal chitosan, as a novel biomolecule. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2013;3(10):811-5.

11. Fakhar M, Chabra A, Rahimi-Esboei B, Rezaei F. In vitro protoscolicidal effects of fungal chitosan isolated from Penicillium waksmanii and Penicillium citrinum. Journal of Parasitic Diseases. 2015;39(2):162-712.

12. Raeisi E, Esboei BR. Insignificant activity of Allium paradoxium and Tanacetum parthenium on protoscoleces of Echinococcus granulosus: In vitro study. Journal of Medicinal Plants Research. 2016;10(42):771-4.

13. Daryani A, Ebrahimzadeh MA, Sharif M, Ahmadpour E, Edalatian S, Esboei BR, et al. Anti-Toxoplasma activities of methanolic extract of Sambucus nigra (Caprifoliaceae) fruits and leaves . Revista de Biología Tropical. 2015;63(1):07-12.

14. Gholami S, Rahimi-Esboei B, Ebrahimzadeh M, Pourhajibagher M. In vitro effect of Sambucus ebulus on scolices of Hydatid cysts. European review for medical and pharmacological sciences. 2013;17(13):1760-5.

15. Rahimi-Esboei B, Ebrahimzadeh M, Fathi H, Rezaei Anzahaei F. Scolicidal effect of Allium sativum flowers on hydatid cyst protoscolices. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(1):129-32.

16. Chabra A, Rahimi-Esboei B, Habibi E, Monadi T, Azadbakht M, Elmi T, et al. Effects of some natural products from fungal and herbal sources on Giardia lamblia in vivo. Parasitology. 2019;146(9):1188-98.6.

17. Atmaca H, İlhan S, Batır MB, Pulat ÇÇ, Güner A, Bektaş H. Novel benzimidazole derivatives: Synthesis, in vitro cytotoxicity, apoptosis and cell cycle studies. Chemico-Biological Interactions. 2020;327:109163.

18. Bahrami A, Jamzad M, Sedaghat S. Phytochemicals and Biological Activities of Froriepia subpinnata (Ledeb.) Baill. Extracts. Journal of Medicinal plants and By-product. 2021;10(1):109-15.

19. Daneshniya M, Maleki MH, Mohammadi MA, Ahangarian K, Kondeskalaei VJ, Alavi H. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Ferula Species' Essential Oils and Plant Extracts and their Application as the Natural Food Preservatives. South Asian Research Journal of Natural Products. 2021:1-23.

20. Mohammadzadeh M, Mahmoudi R, Ghajarbeygi P. Evaluation of chemical composition and antibacterial properties of Froriepia subpinnta essential oils from guilan region: Before and after

flowering. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2018;21(4):1119-27.

21. Huda-Faujan N, Noriham A, Norrakiah A, Babji A. Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. African Journal of Biotechnology. 2009;8(3).

22. Niyyati M, Joneidi Z, KamaliNejad M, Haghighi A, Abadi A, Arab-Mazar Z, et al. In Vitro activity of Mentha longifolia leaves and Pimpinella anisum seeds against a clinical strain of Trichomonas vaginalis. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 2015;5(1):503-9.

23. Bahrami S, Razi Jalali M, Ramezani Z, Pourmehdi Boroujeni M, Toeimepour F. In vitro scolicidal effect of Lepidium sativum essential oil. J Ardabil Univ Med Sci. 2016;15(4):395-403.

24. Moazeni M, Hosseini S, Al-Qanbar M ,Alavi A, Khazraei H. In vitro evaluation of the protoscolicidal effect of Eucalyptus globulus essential oil on protoscolices of hydatid cyst compared with hypertonic saline, povidone iodine and silver nitrate. Journal of visceral surgery. 2019;156(4):29.۵-۱.

25. Gangwar M, Verma VC, Singh TD, Singh SK, Goel R, Nath G. In-vitro scolicidal activity of Mallotus philippinensis (Lam.) Muell Arg. fruit glandular hair extract against hydatid cyst Echinococcus granulosus. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2013;6(8):595-601.

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2021, Volume 9, No. 3: 37-46.

Original article

Evaluation the scolicidal and cytotoxic effects of *Froriepia subpinnata* against protoscolex of *Echinococcus granulosus* in vitro

Bahman Rahimi Esboei[1], Ayatollah Nasrolahi Omran[1], Aroona Chabra[2], Zahra Asadollahi[3], Peyman Heydarian[4*]

1. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

2. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli branch, Amol, Iran

3. Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

4. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Corresponding author: Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran Email: p.heydarian86@gmail.com

Keywords:

Froriepia subpinnata, Echinococcus granulosus, Hydatid cyst, protoscoleces

Abstract

Background & Aim: Hydatidosis is one of the most important and prevalent parasitic diseases in Iran. Due to the fact that no definite and reliable treatment for this disease has been recorded so far, the aim of this study was to investigate the antiparasitic effect of Froriepia subpinnata (F. subpinnata) on the protoscolex stage of Echinococcus granulosus (E. granulosus) in vitro.

Methods: F. subpinnata plant was collected from the forest areas of Mazandaran province and extracted using maceration method and methanolic extract was prepared in concentrations of 50, 100, 200, 400 and 800 µg / ml. Protoscoleces E. granulosus was isolated from the liver, spleen and lungs of sheep. Different concentrations of drug along with albendazole were incubated as positive control in 96 well plates with protoscoleces for 6, 12, 24 and 48 hours and finally the survival rate of the parasite was examined using 0.01% Eosin as vital staining.

Results: According to the results, the survival rate of protoscoleces is significantly reduced as the increase in the concentration of the drug and the incubation time. Concentration of 200 µg / ml of methanolic extract of the F. subpinnata was the most appropriate dose, which eliminated 100% of protoscoleces after 48 hours. The results of MTT test also showed that the methanolic extract of this F. subpinnata, even at a concentration of 1600 µg / ml, had no toxicity on the HeLa cell line.

Conclusion: The results indicated that the F. subpinnata has suitable scolicidal effects and after additional and confirmatory tests can be used as a natural antiparasitic treatment.

How to Cite this Article: Rahimi Esboei B, Omran A, Chabra A, Asadollahi Z, Heydarian P. Evaluation the scolicidal and cytotoxic effects of Froriepia subpinnata against protoscolex of Echinococcus granulosus in vitro. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2021;9(3):37-46.

Copyright © 2020 Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.