

بررسی میزان سمیت و اثر ضد انگلی گیاه اناریجه (*Froriepia subpinnata*) بر روی**مرحله پروتواسکولکس انگل اکینو کوکوس گرانولوزوس در شرایط برون تنی**

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 فارماکوجنوزی، 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 اکینو کوکوس گرانولوزوس در شرایط برون تنی انجام شد.

روش‌ها: گیاه اناریجه از مناطق جنگلی استان مازندران 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 اکینو کوکوس گرانولوزوس از کبد، طحال و ریه گوسفندی جدا شد. غلظت‌های مختلف دارویی 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 غلظت دارو و افزایش زمان 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 بین برد. 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 نشان داد که گیاه اناریجه دارای خاصیت اسکولکس‌کشی مناسب می‌باشد و پس از انجام آزمایشات تکمیلی و تأییدی می‌تواند بعنوان درمان طبیعی ضدانگلی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها:

اناریجه، اکینو کوکوس گرانولوس، کیست هیداتیک، پروتواسکولکس

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

مقدمه

اکینوкокوزیس یا بیماری کیست هیداتیک یکی از مهمترین و قدیمی ترین بیماری های انگلی زئونوز و مشترک بین انسان و علفخواران می باشد که توسط مرحله لاروی کرم اکینوкокوکوس گرانولوزوس ایجاد می شود. این بیماری در اکثر نقاط دنیا دیده می شود و جوامع درگیر را از نظر بهداشتی و اقتصادی محتمل خسارات زیادی می کند (۱، ۲).

سگ و سگ سانان میزبان نهایی انگل محسوب شده و انسان به عنوان میزبان تصادفی، طی خوردن آب، سبزیجات و مواد غذایی آلوده به تخم انگل، مبتلا می شود. اگرچه فرم بالغ انگل در میزبان اصلی، تهدید کننده ی حیات نیست، اما لارو آن در میزبان واسط با ایجاد کیست در بافت های مختلف از جمله کبد، ریه، مغز میتواند موجب بیماری شدید و حتی مرگ شود (۳، ۴).

بیشترین موارد کیست هیداتیک در کبد، ریه و طحال ایجاد می شود ولی در دیگر اندام ها مانند استخوان، کلیه، طحال، ماهیچه ها، اعصاب مرکزی و چشم هم کیست ایجاد می شود (۵). کم اشتهایی و ضعف از علائم عمومی این بیماری است و دل درد، تهوع و استفراغ از علائم شایع ایجاد کیست هیداتید در کبد می باشد. در صورت بروز بیماری در ریه، سرفه مزمن، درد سینه و تنگی نفس از علائم خواهند بود (۶). تشخیص اکینوкокوزیس بر اساس معاینه، علائم بالینی، شرح حال بیمار و سونوگرافی بافت آسیب دیده صورت می گیرد. البته برای تائید بیماری، از روش های سی تی اسکن (CT scan) و تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI: Magnetic resonance imaging) هم استفاده میشود و روش آزمایشگاهی تشخیص این بیماری براساس وجود آنتی بادی های اختصاصی بر علیه کیست هیداتید در سرم بیمار به کمک روش ایمونوفلوئورسنس غیرمستقیم است (۷).

درمان کیست هیداتیک در انسان با توجه به عدم تاثیر قطعی دارو ها از قبیل ترکیبات بنزیمیدازول ها مانند آلبندازول و مبندازول اغلب بعنوان پروفیلاکسی به کار برده می شوند و معمولا پس از عمل جراحی جهت جلوگیری از انتشار و رشد کیست استفاده

می شود (۸). تاکنون داروی موثر و قطعی برای درمان کیست هیداتیک ارائه نشده است و تنها راه درمان و نجات بیماران، عمل جراحی می باشد که در سال های اخیر از روش هایی بنام (Puncture Aspiration Injection Re-PAIR: aspiration) استفاده می شود 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 کیست هیداتیک می باشد. یافتن داروهای جدید با اثرات ضد انگلی 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 سال های اخیر تمایل به استفاده از داروهای گیاهی و ترکیبات طبیعی در سراسر دنیا رو به افزایش است و همچنین بعلت وجود تنوع گیاهان دارویی در کشور ما، 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 اناریچه (*Froriepia subpinnata*) بر روی مرحله لاروی انگل اکینوкокوکوس گرانولوزوس طراحی و اجرا گردید.

روش ها

جمع آوری گیاه و عصاره گیری

در این مطالعه ۵۰۰ گرم از قسمت های هوایی گیاه از مناطق جنگلی در استان مازندران جمع آوری و پس از تهیه هرباریوم گیاه، جنس و گونه گیاه توسط متخصصان بخش فارماکولوژی 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 ۴۰ 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 قرار گرفت. پس از این مرحله، تفاله های گیاهی بوسیله کاغذ واتمن شماره ۱

بودند پروتواسکولکس‌های مرده رنگ قرمز ائوزین را به خود گرفتند (۱۵).

بررسی سایتو توکسیسیته عصاره متانولی گیاه اناریچه

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 داده شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت تعداد سلول‌زنده در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه در غلظت‌های 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 نهایتاً 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 آزمون‌های 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 ماندن پروتواسکولکس‌های انگل اکینوкокوس گرانولوزوس در اثر مجاورت با عصاره متانولی گیاه اناریچه در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بعد از ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط برون تنی مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی مراحل انجام آزمایش در سه بار تکرار شده است. در جدول شماره ۱ میزان اثر ضد انگلی گیاه اناریچه نشان داده شده است. براین اساس میزان اثر ضد انگلی گیاه اناریچه با افزایش غلظت و زمان اثر، افزایش می‌یابد. در این مطالعه همچنین از داروی آلبندازول در غلظت

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 پودر تبدیل شدند. پودر حاصل برای آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۳).

جداسازی پروتواسکولکس انگل اکینوкокوس 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 سرنگ استریل ۵۰ سی سی اسپیره 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 نمونه‌هایی که بیش از ۹۰٪ زنده بودند، جهت انجام مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (۱۴).

بررسی اثر ضد انگلی عصاره متانولی گیاه اناریچه

در این مطالعه عصاره‌گیاهی در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تهیه شد. و برای بررسی عصاره گیاهی از پلیت‌های ۲۴ خانه ایی استفاده شد. به هر چاهک مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اسپیره شده مایع کیست حاوی تقریباً 1×10^4 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 (CO₂) 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 ماندن پروتواسکولکس‌ها را مورد ارزیابی قرار گرفت. بطوری که رنگ حیاتی وارد پروتواسکولکس‌های زنده نمی‌شود و این سلول‌ها به رنگ سفید یا بی‌رنگ

میزان اثربخشی عصاره اناریچه در غلظت های ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بهتر از آلبندازول بود با این تفاوت که اختلاف اثر آلبندازول با غلظت ۴۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از لحاظ آماری معنی دار نبود ($p=0/63$) در صورتی که با غلظت ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر اثر معنی داری داشت ($p=0/16$)

۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بعنوان گروه کنترل استفاده شد که میزان اثر آن با اختلاف معنی داری بهتر از غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بوده است ($p=0/03$). در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر میزان اثر ضدانگلی آلبندازول از گیاه اناریچه در همین غلظت بهتر بود، اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود ($p=0/084$)

جدول ۱: میزان اثر عصاره متانولی گیاه اناریچه بر روی زندهمانی پروتواسکولکس های انگل اکینووکوکوس گرانولوزوس برحسب

غلظت های مختلف دارو و شرایط زمانی متفاوت

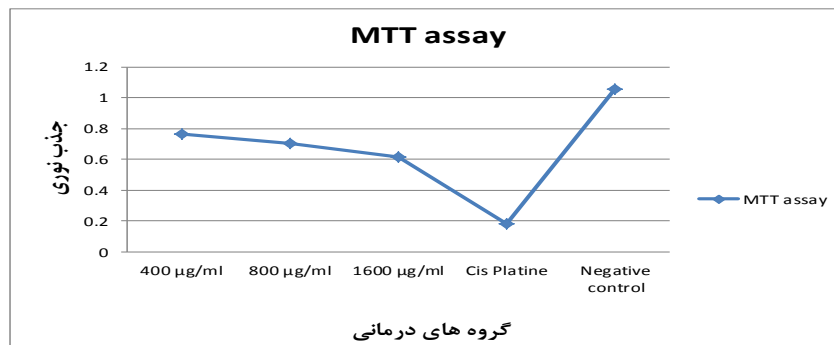
P-value*	تعداد تست زمان (ساعت)					میزان زنده مانی (%)
	۴۸	۲۴	۱۲	۶		
۰/۰۰۱	۲۱	۴۳	۶۷	۸۶	۱	۵۰
	۱۸	۳۷	۷۶	۶۷	۲	
	۱۷	۴۱	۶۴	۷۹	۳	
	۱۸/۶۶	۴۰/۳۳	۶۹	۷۷/۳۳		میانگین
۰/۰۰۱	۱۱	۳۱	۵۱	۵۶	۱	۱۰۰
	۷	۲۶	۴۵	۶۰	۲	
	۰	۱۱	۴۹	۵۸	۳	
	۶	۲۲/۶۶	۴۸/۳۳	۵۸		میانگین
۰/۰۰۱	۰	۹	۲۶	۴۵	۱	۲۰۰
	۰	۱۳	۳۱	۵۱	۲	
	۰	۰	۲۳	۴۷	۳	
	۰	۷/۳۳	۲۶/۶۶	۴۷/۶۶		میانگین
۰/۰۰۱	۰	۰	۱۲	۴۲	۱	۴۰۰
	۰	۰	۹	۴۱	۲	
	۰	۰	۰	۴۶	۳	
	۰	۰	۷	۴۳		میانگین
۰/۰۰۱	۰	۰	۰	۴۴	۱	۸۰۰
	۰	۰	۰	۳۱	۲	
	۰	۰	۰	۴۳	۳	
	۰	۰	۰	۳۹/۳۳		میانگین
	۰	۳	۱۵	۵۲	۱	آلبندازول (۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)
	۰	۰	۷	۴۹	۲	
	۰	۰	۱۳	۴۶	۳	
	۰	۱	۱۱/۶۶	۴۹		میانگین

	۶۵	۷۷	۹۱	۹۴	۱	کنترل منفی (بدون دارو)
	۶۹	۸۴	۸۷	۹۵	۲	
	۵۸	۸۳	۸۵	۹۱	۳	
	۶۴	۸۱/۳۳	۸۷/۶۶	۹۳/۳۳	میانگین	
	۰/۰۰۱				سطح معنی داری	

* one-way ANOVA و Student's t-test

با توجه به شکل ۱، نتایج نشان می دهد که سمیت ناشی از عصاره متانولی گیاه اناریجه در بالاترین غلظت مورد استفاده (۱۶۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) کمتر از داروی سیس پلاتین بوده و این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($p=0/001$)

همچنین در این مطالعه علاوه بر بررسی اثرات ضد انگلی، میزان سمیت غلظت های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ 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 قرار گرفت.



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

های HeLa

مورد ارزیابی قرار گرفت. برطبق یافته ها، اناریجه از گیاهان بومی استان های شمالی (گیلان، مازندران و گلستان) کشور ما می باشد که بصورت خوراکی مصرف می شود. نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی نشان داد که هیدروکربن های مونوترپن شامل لیمونن، ترپینولن و فلاونوئیدها از فراوانترین ترکیب شناسایی شده در اسانس اناریجه می باشند. 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 داده اند که گیاه اناریجه میتواند بعنوان یک آنتی بیوتیک طبیعی مورد استفاده قرار گیرد (۱۹، ۲۰). هودا

بحث

بیشترین داروهایی که در درمان اکتینوکوکوزیس مورد استفاده قرار می گیرند، 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 کیست هیدراتیک از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه میزان زندهمانی پروتواسکولکس های انگل اکتینوکوکوس گرانولوزوس در اثر مجاورت با عصاره متانولی گیاه اناریجه

در مطالعات مختلف، اثرات ضد انگلی گیاهان و ترکیبات متعددی را مورد بررسی قرار دادند. بعنوان نمونه جلالی و همکاران در سال ۱۳۹۴ تأثیر آلبندازول، اکیناسه پورپوره آ، آقطی و نانوذرات اکسید روی بر کیست هیداتیک تک حفره ای در موش کوچک آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که تعداد، اندازه و حجم کیستها در گروه‌های درمان شده در مقایسه با گروه شاهد آلوده کاهش معنی‌داری داشت. کم‌ترین تعداد کیست در گروه درمانی اکیناسه و کم‌ترین 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 نانوآکسید روی در غلظت ۴۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن در مطالعه‌ی حاضر مؤید اثرات کاهشی مشخص در تعداد، اندازه و حجم کیست بود (۲۳) که در مقایسه با مطالعه حاضر از غلظت دارویی 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. پروتواسکولکس‌ها با مقادیر ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه مواجه شده‌اند. میزان ۱۰۰٪ پروتواسکولکس‌ها پس از این که به مدت ۱۰ دقیقه در معرض غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر اسانس گیاه زنیان به مدت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه مواجه شده‌اند. میزان ۱۰۰٪ پروتواسکولکس‌ها پس از این که به مدت ۱۰ دقیقه در معرض غلظت 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 می‌تواند به عنوان یک اسکولوسیدال طبیعی استفاده شود (۲۴). در بررسی اثرات عصاره‌ی میوه‌ی گیاه مالاتوس فیلیپینی (*Mallotus philippinensis*) مشخص شد که غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره بعد از مدت زمان ۶۰ دقیقه به ترتیب سبب از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها به میزان ۹۷ و ۹۸ درصد شد. غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره در زمان بیش از ۲ ساعت باعث از بین رفتن کامل پروتواسکولکس‌ها گردید (۲۵). در مطالعه حاضر بالاترین غلظت مورد بررسی، غلظت ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بود که نسبت به مطالعات بالا بسیار

(Huda) و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گیاه اناریجه را بر روی باکتری‌های گرم مثبت مانند باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوک اورئوس، باکتری‌های گرم منفی مانند اشیریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا و قارچ‌های آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار دادند 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 کلروفومی و متانولی بهترین اثر را روی باکتری‌های اشیریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه دارند، عصاره اتیل‌استاتی و متانولی بهترین اثر را روی سودوموناس آئروژینوزا داشته‌اند و از بین عصاره‌های مورد بررسی، بهترین اثر ضد قارچی بر علیه آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکنز مربوط به عصاره اتیل‌استاتی 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 (Niyati) 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 ۲۴ و ۴۸ ساعت توانسته است که بترتیب ۷/۷۳ و ۹/۸۶٪ از تروفوزوئیت‌های انگل تریکوموناس واژینالیس را از بین ببرد (۲۲). در مطالعه حاضر اثر ضد انگلی گیاه اناریجه در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بر روی مرحله لاروی انگل اکینووکوس گرانولوزوس ارزیابی گردید و نتایج نشان داد که عصاره متانولی این گیاه در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر و غلظت‌های بالاتر موجب مرگ بیش از ۵۰ درصد پروتواسکولکس‌ها شده‌اند و در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر حتی اثرات بهتر از داروی آلبندازول داشته‌اند که بعنوان داروی اصلی و متداول این بیماری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کلیه شرکت کنندگان در این پژوهش که با سعه صدر، همکاری نمودند و ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند. این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد ۲۹/۲/۴۶۵۲ 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 بازرینی 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

کمتر بوده است. همچنین نتایج نشان داد که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت، غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت و غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۱۲ ساعت موجب مرگ ۱۰۰ درصدی پروتواسکولکس های انگل اکینوкокوس گرانولوزوس شده است 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 ۱۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز فاقد سمیت می باشد.

نتیجه گیری

براساس نتایج، عصاره متانولی گیاه اناریجه در غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثر ضد انگلی قوی بر روی پروتواسکولکس های انگل اکینوкокوس گرانولوزوس در شرایط برون تنی دارد و میتواند پس از انجام مطالعات تکمیلی در فاز های درون تنی و فاز انسانی، بعنوان ترکیب طبیعی ضد انگلی برای درمان بیماری کیست هیداتیک مورد استفاده قرار گیرد. بهترین غلظت و زمان برای این گیاه، غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت می باشد که بعنوان دوز موثر دارو در نظر گرفته شده است.

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, Mohebbali 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. Larriue E, Gavidia CM, Lightowers 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-Alegria Á, Burguillo FJ, Muro A, et al. Medical treatment of cystic echinococcosis: systematic review and meta-analysis. *BMC infectious disease* 2018;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 scolocidal 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 protoscolocidal 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 scolocidal 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.

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

Bahman Rahimi Esboei¹, Ayatollah Nasrolahi Omran¹, Aroona Chabra², Zahra Asadollahi³,
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

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.

Keywords:

Froriepia subpinnata,
Echinococcus granulosus, Hydatid cyst, protoscoleces

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.