

بررسی اثرات اسکولکس کشی میوه زرشک بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۱/۱۰

نیما صالحی^۱، سهیلا روحانی^{۱*}
محمد کمالی نژاد^۲
فرید زائری^۳، افشین متقی فر^۴

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ۲- گروه مطالعات دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ۳- گروه آمار زیستی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ۴- گروه دامپزشکی

زمینه و هدف: جراحی یکی از بهترین راه‌های درمان کیست هیداتیک است. استفاده از مواد پروتواسکولکس کش در حین جراحی کیست هیداتیک جهت جلوگیری از به‌وجود آمدن کیست‌های ثانویه، امری ضروری می‌باشد. تا به حال ماده پروتواسکولکس کشی که به‌طور کامل موثر بوده و عوارض جانبی کمی داشته باشد شناخته نشده است. زرشک از گیاهان بومی ایران است که از دیرباز جهت درمان برخی بیماری‌ها از آن استفاده شده است. مطالعات نشان می‌دهد که این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدانگلی است.

روش بررسی: کبدهای آلوده به کیست هیداتید از کشتارگاه جمع‌آوری شدند. درصد حیات پروتواسکولکس‌ها توسط رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین ۰/۱٪ سنجیده شد. فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ mg/ml و عصاره آبی - الکلی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان‌های ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. سرم فیزیولوژی و آب نمک اشباع به عنوان کنترل منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: غلظت ۴ mg/ml عصاره آبی زرشک مانند کنترل مثبت عمل کرد و در پنج دقیقه اول مواجهه ۱۰۰٪ پروتواسکولکس‌ها را از بین برد. کم‌ترین درصد پروتواسکولکس کشی (۱۲/۳٪) مربوط به رقت ۰/۵ mg/ml بود. عصاره آبی - الکلی در غلظت ۲ mg/ml در پنج دقیقه اول مواجهه ۱۰۰٪ پروتواسکولکس‌ها را از بین برد که مشابه کنترل مثبت بود. در هر دو عصاره، فعالیت پروتواسکولکس کشی با افزایش رقت، افزایش یافت ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: اثر پروتواسکولکس کشی عصاره آبی و آبی - الکلی میوه زرشک در رقت پایین و زمان کم بسیار چشمگیر بوده است. بنابراین این ماده می‌تواند پس از بررسی در مدل حیوانی و آزمایش‌های تکمیلی، به‌عنوان پروتواسکولکس کش موثر و مناسب، مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اکینوкокوس گرانولوزوس، کیست هیداتیک، *Berberis vulgaris*.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه چمران، ولنجک، خیابان یمن، میدان دانشجو، بلوار دانشجو، خیابان کودکیار

تلفن: ۰۲۱-۲۳۸۷۲۵۶۴
E-mail: srouhani11@sbmu.ac.ir,
srouhani11@yahoo.com

مقدمه

افریقا، خاور دور و خاورمیانه به‌صورت اندمیک وجود دارد و هنوز به‌عنوان یک مشکل بهداشتی باقی مانده است هم‌چنین در برخی از کشورها به‌عنوان یک بیماری بازپدید مطرح است.^{۱-۵} جراحی و استفاده از روش Puncture, Aspiration, Injection and Reaspiration (PAIR) از مهم‌ترین و بهترین روش‌های درمان این بیماری است. با توجه به تحت فشار بودن کیست هیداتیک، پاره شدن و انتشار مایع هیداتید حاوی پروتواسکولکس در هنگام جراحی پدیده‌ای غیرعادی

هیداتیدوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوزی است که توسط فرم لاری کرم‌های نواری جنس اکینوкокوس ایجاد می‌شود. گونه غالب این انگل یعنی اکینوкокوس گرانولوزوس در اندام داخلی علف‌خواران و انسان باعث ایجاد کیست هیداتید تک حبابچه‌ای می‌گردد.^۱ این بیماری در برخی از مناطق دنیا مانند استرالیا، شمال

شناخته شده است. سابقه این گیاه به عنوان یک گیاه شفابخش به بیش از ۲۵۰۰ سال قبل می‌رسد. این گیاه در اغلب نواحی اروپای مرکزی و جنوبی، شمال غربی ایالات متحده امریکا، افریقای شمالی و مناطق معتدل آسیا وجود دارد.^{۱۳} این گیاه، یکی از گیاهان بومی منطقه بیرجند و خراسان جنوبی است که برای بخش‌های مختلف این گیاه یعنی میوه، ساقه و ریشه خواص گوناگونی ذکر شده است. بررسی‌های آزمایشگاهی نیز بیانگر این است که آلکالوئیدهای این گیاه خاصیت ضدباکتری، ضدقارچی، ضدانگلی، ضدالتهابی، کاهش دهنده تب، ضددرد و تشنج و اثراتی نیز روی عضلات صاف دارد. Ghaderi اثر ضدکاندیدایی عصاره ریشه زرشک را بر روی سلول‌های مخمری کاندیدا آلیکانس را با داروی ضدقارچی کلوتریمازول مقایسه کرد. پژوهش‌گران اذعان می‌نمایند که عصاره ریشه زرشک دارای خواص ضدکاندیدایی هستند.^{۱۴} Kazemi اثر عصاره الکلی زرشک را بر روی زخم‌های ناشی از لیشمانیا ماژور در موش Balb/c را مورد بررسی قرار داد. پژوهش‌گران اظهار داشته‌اند که رقت ۳۰٪، هم در کاهش قطر زخم و هم در کاهش تعداد انگل موثر است، بنابراین می‌توان استفاده از این گیاه دارویی را جهت بررسی بر روی موارد انسانی پیشنهاد نمود.^{۱۵} با توجه به بازنگری‌های انجام شده، تاکنون خاصیت پروتواسکولکس کشی گیاه زرشک مورد بررسی قرار نگرفته است، در این پژوهش برای اولین بار تاثیر عصاره آبی و آبی-الکلی میوه زرشک در رقت‌ها و زمان‌های مختلف بر روی پروتواسکولکس‌های اکینوкокوس گرانولوزوس بررسی شد.

روش بررسی

این پژوهش که در سال ۱۳۹۱ انجام شد از نوع تجربی (Experimental) بود. برای انجام آن کبد آلوده به کیست هیداتید از کشتارگاه میثم تهیه و به آزمایشگاه گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شد پس از چندین مرتبه شستشو با نرمال سالین درصد حیات اولیه (Primary viability) پروتواسکولکس‌ها توسط رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین ۰/۱٪ با میکروسکوپ نوری و به کمک دستگاه Cell Counter LC-10 (Labtron Electromax; Hauppauge, NY) تعیین گردید. پروتواسکولکس‌های زنده، بی‌رنگ و شفاف باقی می‌ماند در

نیست^{۱۶} و همین امر مهم‌ترین علت عود این بیماری است از این روی استفاده از مواد کشنده پروتواسکولکس‌ها (Scolicidal) در حین جراحی ضروری است. تا به امروز محلول‌های مختلف پروتواسکولکس کش در جراحی و روش زیرجلدی مورد استفاده قرار گرفته‌اند^{۱۷} هرچند ماده ایده‌آلی که به‌طور کامل مؤثر و هم‌چنین بدون عارضه جانبی باشد تاکنون شناخته نشده است.^۱ محلول نمک هیپرتونیک، نیترا ت نقره، ستریمیدین (Cetrimide) و فرمالین از متداول‌ترین پروتواسکولکس کش‌ها می‌باشند که هر کدام عوارض خطرناکی مانند فیروز مجاری صفراوی و نکروز کبد را باعث می‌شوند.^{۱۷-۱۸} کلانژیت اسکروزان ناشی از این مواد، عارضه خطرناکی است که ممکن است بعد از جراحی و عبور محلول‌های پروتواسکولکس کش از مجاری صفراوی ایجاد گردد^{۱۹} از این‌رو سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیاز فوری به یافتن یک پروتواسکولکس کش جدید، با تأثیر بیشتر و عوارض کم‌تر را اعلام نموده است.^{۱۲}

تنوع ساختمانی حیرت‌انگیز ترکیبات فعال گیاهان دارویی و نامحدود بودن منابع این گیاهان، آن‌ها را به‌عنوان منبع مفیدی از ترکیبات درمانی نوین معرفی کرده است.^{۱۳} در بررسی انجام شده توسط Mahdavi اثر پروتواسکولکس کشی عصاره آبی، الکلی و آلکالوئیدهای تام دانه اسپند (*Peganum harmala*) بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید مورد بررسی قرار گرفت، نتایج حاکی از این مسئله است که عصاره آبی نسبت به الکلی تأثیر بسیار ناچیزی بر روی پروتواسکولکس‌ها داشته است. هم‌چنین توان پروتواسکولکس کشی آلکالوئیدهای تام دانه اسپند به مراتب بیشتر از خاصیت پروتواسکولکس کشی عصاره الکلی آن بوده است.^{۱۴} در بررسی انجام شده توسط Sajjadi اثر عصاره‌های آبی، الکلی و کلروفرمی سیر (*Allium sativum*) در زمان‌های مختلف بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بیانگر این مسئله است که فعالیت پروتواسکولکس کشی سیر با افزایش زمان مواجهه فزونی می‌یابد و عصاره کلروفرمی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بیش‌ترین اثر پروتواسکولکس کشی را دارا می‌باشد.^{۱۵}

زرشک گیاهی است با نام علمی *Berberis vulgaris* نام متداول آن *Barberry* است که در کشورهای مختلف با اسامی متفاوتی

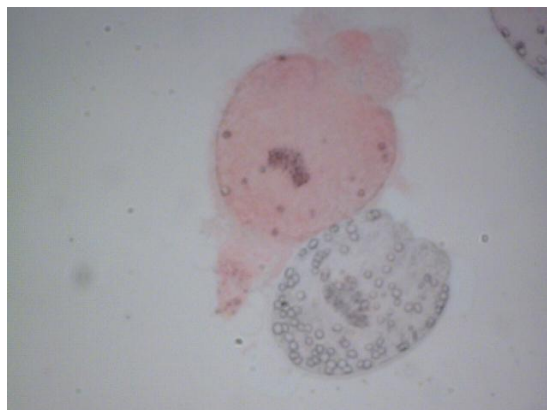
سوسپانسیون پروتواسکولکس، چهار واحد (۸۰۰ میکرولیتر) محلول آبی یا آبی-الکلی زرشک با رقت های یاد شده در لوله های جداگانه اضافه شد هم چنین به هر یک از لوله ها دو قطره اتوزین ۰/۱٪ اضافه گردید. بعد از ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه تأثیر رقت های مختلف عصاره آبی و آبی-الکلی زرشک با شمارش پروتواسکولکس های زنده بررسی و ثبت گردید. هریار ۱۰۰ عدد پروتواسکولکس شمارش گردید، برای دقت بیشتر، عمل شمارش برای هر مرحله از مطالعه، پنج مرتبه انجام شد و از درصدها میانگین تهیه شد.

در این پژوهش آب نمک اشباع (Saturated saline) و سرم فیزیولوژی (Normal saline) به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. جهت ثابت نگه داشتن درصد مواد مؤثر بر روی سوسپانسیون پروتواسکولکس ها، هر واحد محلول معادل ۲۰۰ میکرولیتر (لاندا) در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها، در ابتدا مقادیر حیات پروتواسکولکس ها پس از مجاورسازی، نسبت به حیات اولیه، برای هر کیست محاسبه و این مقادیر به عنوان فعالیت پروتواسکولکس کشی اعلام شد.

توصیف داده ها به کمک آمارهای توصیفی نظیر میانگین و انحراف معیار توسط نرم افزار SPSS ویراست ۱۶ انجام شد. برای ارزیابی اثر هم زمان نوع درمان و زمان بر تغییرات حیات، از آزمون تحلیل واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و آزمون مقایسه ای چندگانه Tukey استفاده شد.

یافته ها

میانگین و انحراف معیار فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی زرشک و کنترل مثبت و منفی بر حسب زمان و رقت های مختلف در جدول ۱ آمده است. همان گونه که پیش تر بیان شد، تفاوت مقادیر حیات پس از مجاورسازی، نسبت به مقادیر حیات قبل از مجاورسازی به عنوان فعالیت پروتواسکولکس کشی در نظر گرفته شد. در تمام آزمایش ها رقت ۴ mg/ml همانند کنترل مثبت عمل کرده و میانگین فعالیت پروتواسکولکس کشی آن ۱۰۰٪ بوده است. خاصیت پروتواسکولکس کشی رقت ۲ mg/ml بسیار نزدیک به ۴ mg/ml بود و میانگین کل آن ۹۷/۶٪ گزارش شد. با توجه به جدول ۲، اثر پروتواسکولکس کشی عصاره آبی-الکلی بیش تر از



شکل ۱: پروتواسکولکس زنده (راست) و پروتواسکولکس مرده (چپ)

حالی که پروتواسکولکس های مرده به علت نفوذ رنگ اتوزین، قرمز رنگ دیده می شوند (شکل ۱). جهت تهیه عصاره آبی زرشک مقدار ۱۰۰ گرم از میوه زرشک به همراه ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد، پس از سرد شدن، محلول به دست آمده صاف شد و به وسیله دستگاه Rotary evaporator Heidolph WB 2000, Germany تغلیظ گردید. جهت تهیه عصاره آبی-الکلی زرشک، مقدار ۱۰۰ گرم از میوه زرشک به همراه ۱۰۰۰ ml محلول آب و الکل اتیلیک ۹۶٪ به نسبت (۵۰:۵۰) به مدت ۷۲ ساعت دور از نور و حرارت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد سپس محلول به دست آمده صاف شد و با دستگاه Rotary evaporator تغلیظ گردید.^{۱۸}

بعد از مطالعات اولیه (Pilot study) که بر روی ۱۰ عدد کیست، جهت تعیین رقت های مناسب عصاره و حجم نمونه انجام شد. در نهایت از رقت های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی گرم عصاره آبی زرشک و رقت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم عصاره آبی-الکلی زرشک در میلی لیتر آب مقطر استفاده شد.

با توجه به نتایج مطالعه اولیه، حجم نمونه برای این مطالعه تعداد ۳۰ عدد کیست محاسبه شد با توجه به این که تأثیر شش نوع ماده شامل چهار رقت عصاره های زرشک به همراه کنترل مثبت و منفی، در سه زمان مختلف بر روی پروتواسکولکس ها بررسی شد، در واقع $3 \times 6 \times 3 = 540$ مرتبه آزمایش جهت هر کدام از این مطالعات انجام شد. برای انجام این پژوهش به یک واحد (۲۰۰ میکرولیتر)

کشی عصاره آبی ۰/۵ mg/ml بسیار کم و منحنی آن نزدیک به کنترل منفی است. حال آن که عصاره ۲ mg/ml نزدیک به عصاره ۴ mg/ml و کنترل مثبت است و منحنی آن‌ها بر هم منطبق می باشد در حالی که عصاره ۱ mg/ml با فاصله از این رقت‌ها قرار گرفته است، این بدان معنی است که خاصیت پروتواسکولکس کشی آن به طور معناداری کم‌تر از گروه فوق می‌باشد ($P < 0/05$). در نمودار ۲، فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی- الکی ۰/۲۵ mg/ml نزدیک به کنترل منفی است. منحنی عصاره ۱، ۲ mg و کنترل مثبت کمابیش بر هم منطبق است. در حالی که منحنی عصاره ۰/۵ mg/ml با فاصله از رقت‌های اخیر قرار گرفته است و اثر پروتواسکولکس کشی این رقت به‌طور معناداری از گروه فوق کم‌تر است ($P < 0/05$).

عصاره آبی زرشک است. حتی در رقت ۱ mg/ml در پنج دقیقه اول مواجهه، ۹۹/۵۶٪ پروتواسکولکس‌ها از بین رفته‌اند. این رقت عصاره بعد از ۳۰ دقیقه مواجهه، باعث از بین رفتن ۱۰۰٪ پروتواسکولکس‌ها شده است. رقت ۲ mg/ml عصاره آبی- الکی همانند کنترل مثبت عمل کرده و میانگین فعالیت پروتواسکولکس کشی آن ۱۰۰٪ بوده است. برای توصیف بهتر نتایج، از آزمون تحلیل واریانس دو طرفه (two-way ANOVA) استفاده شد و نشان داد که افزایش رقت‌های مجاورسازی تاثیر معناداری بر خاصیت پروتواسکولکس کشی دارد ($P < 0/01$). نمودار ۱ و ۲، تغییرات حیات پروتواسکولکس‌ها برای انواع مجاورسازی (رقت‌های مختلف عصاره آبی و آبی- الکی) برحسب زمان را نشان می‌دهد. در نمودار ۱، فعالیت پروتواسکولکس

جدول ۱: مقایسه فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی زرشک بر حسب زمان و رقت‌های مختلف

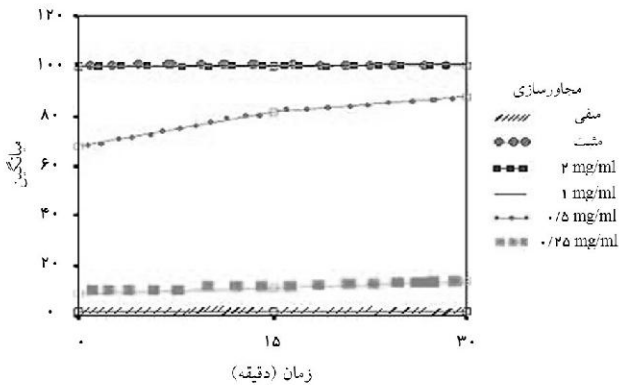
رقت عصاره (mg/ml)	زمان (دقیقه)					
	۵		۱۵		۳۰	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۰/۵	۷/۹ ^a	۱۸/۸	۱۲/۹ ^a	۲۵/۸	۱۶/۹ ^a	۳۰/۰
۱	۵۲/۰ ^b	۳۷/۱	۶۸/۸ ^b	۳۵/۸	۷۶/۵ ^b	۳۳/۰
۲	۹۶/۰ ^c	۷/۹	۹۸/۰ ^c	۴/۹	۹۸/۷ ^c	۳/۷
۴	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰
کنترل مثبت*	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰
کنترل منفی**	۱/۵۹ ^a	۱/۷۶	۱/۵۹ ^a	۱/۷۶	۱/۷۶	۱/۷۶

* کنترل مثبت = آب نمک اشباع، ** کنترل منفی = سرم فیزیولوژی، abc حروف کوچک یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معناداری ($P \geq 0/05$) در آزمون مقایسه‌ای چندگانه Tukey هستند

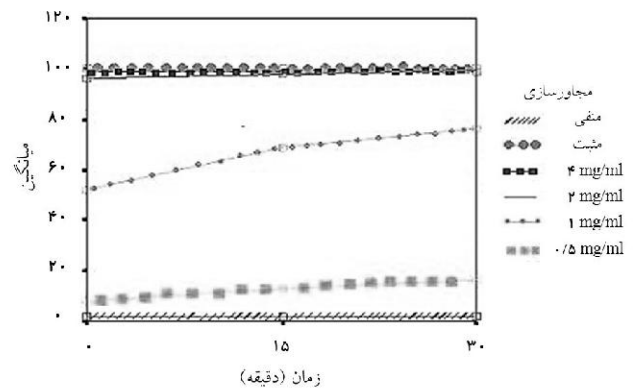
جدول ۲: مقایسه فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی- الکی زرشک بر حسب زمان و رقت‌های مختلف

رقت عصاره (mg/ml)	زمان (دقیقه)					
	۵		۱۵		۳۰	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۰/۲۵	۸/۸۶ ^a	۲۱/۷	۱۰/۹۶ ^a	۲۴/۴	۱۳/۸۵ ^a	۲۷
۰/۵	۶۸/۰۸ ^b	۳۲	۸۱/۶۶ ^b	۲۷/۹۴	۸۷/۷۹ ^b	۲۵/۵۸
۱	۹۹/۵۶ ^c	۱/۰	۹۹/۸۲ ^c	۰/۶۳	۱۰۰ ^c	۰/۰۰
۲	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰
کنترل مثبت*	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰	۱۰۰ ^c	۰/۰۰
کنترل منفی**	۱/۶۸ ^d	۱/۸	۱/۶۸ ^d	۱/۸	۱/۶۸ ^d	۱/۸

* کنترل مثبت = آب نمک اشباع، ** کنترل منفی = سرم فیزیولوژی، abcd حروف کوچک یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معناداری ($P \geq 0/05$) در آزمون مقایسه‌ای چندگانه Tukey هستند



نمودار ۲: روند تغییرات میانگین فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی-الکلی برای انواع مجاورسازی در طول زمان



نمودار ۱: روند تغییرات میانگین فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی برای انواع مجاورسازی در طول زمان

محلول با غلظت های مختلف (۳۰-۳٪) و زمان مواجهه مختلف (۳۰-۵ دقیقه) به مدت پنجاه سال مورد استفاده قرار گرفته است.^{۲۵} نیترات نقره ۲۰٪ در ۲۰ دقیقه، دکستروز ۵۰ درصد و آمینومیکس ۱ (Aminomix-1 solution) در عرض ۳۰ دقیقه، محلول نمک ۲۰٪ و مانتیول ۲۰٪ در مدت ۴۵ دقیقه باعث از بین رفتن پروتو-اسکولکس ها شده است. آلبندازول در رقت ۲۰ mg/ml در پنج دقیقه اول مواجهه باعث مرگ ۶۵٪ پروتواسکولکس ها و در ۶۰ دقیقه باعث از بین رفتن ۷۰٪ آن ها شده است. در این بررسی تمام این پروتواسکولکس کش ها در مقایسه با کنترل، بر روی پروتواسکولکس ها موثر بوده اند. اغلب این مواد به خاطر عوارض جانبی نظیر کولانژیت اسکروزان سوزاننده (Caustic sclerosing cholangitis)، تنگی مجاری صفراوی و افزایش سدیم خون مواد مطمئن و بی ضرری نیستند.^{۲۶} یک پروتواسکولکس کش مناسب باید با دوز کم و به سرعت باعث از بین رفتن پروتواسکولکس ها گردد و در مایع هیداتید پایدار بوده و خاصیت پروتواسکولکس کشی خود را با رقیق شدن در مایع هیداتید حفظ کند. علاوه بر پروتواسکولکس، بر روی کیست های دختر نیز موثر باشد، سمی نباشد و عوارض جانبی موضعی و سیستمیک آن حداقل باشد، هم چنین تهیه آن راحت، به سرعت در دسترس و ارزان باشد. با این ویژگی های بیان شده تاکنون هیچ ماده یا محلول ایده آلی شناسایی نشده است.^{۲۷، ۲۸} از این رو سازمان جهانی بهداشت (WHO) نیاز فوری به یافتن یک

بحث

عصاره میوه زرشک در این مطالعه به عنوان پروتواسکولکس کش مورد استفاده قرار گرفت. ریشه، ساقه، برگ و میوه زرشک شامل آلکالوئیدهای ایزوکینولین مانند بربرین است که از ترکیبات اصلی و فعال آن می باشند.^{۱۹} علی رغم وجود پژوهش های متعدد در مورد اثرات گیاه زرشک بر روی میکروارگانیسم ها مانند برخی قارچ ها نظیر کاندیدا آلبیکانس^{۱۶} و بعضی از انگل ها مانند لیشمانیا،^{۱۷} تا به امروز مطالعه ای بر روی خاصیت پروتواسکولکس کشی میوه زرشک صورت نگرفته است و این اولین گزارش در این مورد است. مناسب ترین راه درمان کیست هیداتیک کبدی جراحی است، هر چند دارو درمانی و روش PAIR گزینه بعدی است، به خصوص در بیمارانی که جراحی در آن ها با مشکلاتی همراه است و جراحی امکان پذیر نمی باشد.^{۲۱، ۲۰}

یکی از مهم ترین نکات در جراحی کیست هیداتید، عود بیماری است و انتشار پروتو اسکولکس های موجود در مایع هیداتید و برداشت ناقص لایه زایا از حفره کیست مهم ترین دلیل عود بیماری است که کمابیش در ۱۰٪ موارد بعد از جراحی دیده می شود.^{۲۲-۲۳} مواد پروتو اسکولکس کش مختلف برای استریل کردن محتویات داخل کیست مورد استفاده قرار می گیرد. محلول هیپرتونیک نمک یکی از متداول ترین مواد پروتواسکولکس کش در دنیا است. این

کلروفومی سیر (*Allium sativum*) به همراه کنترل مثبت و منفی بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید، در زمان‌های ۳۰ دقیقه، یک، دو، چهار و شش ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بیانگر این مسئله است که فعالیت پروتواسکولکس کشی سیر با افزایش زمان مواجهه فزونی می‌یابد و عصاره کلروفومی با غلظت ۲۰۰ mg/ml، بیش‌ترین اثر پروتواسکولکس کشی را دارا می‌باشد.^{۱۵} Kilocoglu، اثر پروتواسکولکس کشی عسل را با رقت‌های ۱٪، ۵٪، ۱۰٪، ۲۵٪ و ۵۰ درصد و در زمان‌های ۰/۵، یک، دو، سه، چهار، پنج و ۱۰ دقیقه مورد بررسی قرار داد. غلظت ۱۰٪ و بیش‌تر عسل، تمام پروتواسکولکس‌ها را از بین برد، خاصیت پروتواسکولکس کشی بعد از دقیقه سوم مشاهده گردید.^{۱۶} Kismet اثر کشندگی عصاره الکلی پروپولیس را در رقت‌ها و زمان‌های مختلف بر روی پروتواسکولکس‌ها مورد بررسی قرار داد. غلظت ۱ μg/ml آن در عرض سه دقیقه تمامی پروتواسکولکس را از بین برد.

محققان معتقدند که این ماده طبیعی بعد از بررسی اثرات آن در موجود زنده (*In vivo*) و اثرات آن بر روی کبد و مجاری صفراوی می‌تواند به‌عنوان یک پروتواسکولکس کش موثر مورد استفاده قرار گیرد.^{۳۰} با توجه به نمودار ۱ و ۲، رقت ۱ mg/ml عصاره آبی و عصاره ۰/۵ mg/ml عصاره آبی - الکلی از پنج دقیقه تا ۱۵ دقیقه شیب تندتری نسبت به مجاورت این عصاره از ۱۵ دقیقه تا ۳۰ دقیقه نشان داده است و به‌نظر می‌رسد که بیش‌تر پروتواسکولکس‌ها در این رقت‌ها تا ۱۵ دقیقه بعد از مجاورت با عصاره آبی و عصاره آبی - الکلی از بین می‌روند. به‌نظر می‌رسد که عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی (آبی، آبی - الکلی و کلروفومی) اثرات متفاوتی بر روی میکروارگانیسم‌ها دارند که احتمال دارد حلال مورد استفاده در تهیه این عصاره‌ها می‌تواند بر روی ترکیبات و میزان مواد موثر این عصاره‌ها تاثیرگذار باشند.

پیشنهاد می‌گردد میزان پایداری و رقت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی و عصاره آبی - الکلی در مایع هیداتید نیز تعیین گردد هم چنین اثر پروتواسکولکس کشی عصاره کلروفومی میوه زرشک نیز مورد بررسی قرار گیرد. جهت استفاده عصاره زرشک به‌عنوان پروتواسکولکس کش در جراحی، مطالعات تکمیلی برای بررسی عوارض جانبی آن بر روی سلول‌های کبدی در حیوانات آزمایشگاهی ضروری به‌نظر می‌رسد.

پروتواسکولکس کش جدید با تاثیر زیاد و عوارض کم را اعلام نموده است.^{۱۲} امروزه ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی ارزیابی شده و به‌عنوان جایگزین مواد شیمیایی در از بین بردن میکروارگانیسم‌ها مطرح است. عصاره متالونیک دو گیاه هندی *Allium sativum* (garlic) و *Withania Somnifera Dunal* (ashwagandha) فعالیت قابل ملاحظه‌ای بر علیه لیشمانیا دنوانی نشان داده است.^{۲۸} در بررسی ما، رقت ۴ mg/ml عصاره آبی زرشک تمام پروتواسکولکس‌ها را در عرض پنج دقیقه از بین برده است و خاصیت پروتواسکولکس کشی رقت ۲ mg/ml بعد از ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه به‌ترتیب ۹۶٪، ۹۸٪ و ۹۸٪ بوده است. نتایج کنترل مثبت (آب نمک اشباع) با عصاره ۴ mg/ml به‌طور کامل یکسان بوده است ولی با رقت ۲ mg/ml تفاوت اندکی داشته است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدول ۱، حتی رقت ۰/۵ mg/ml عصاره آبی خاصیت پروتواسکولکس کشی ضعیفی داشته که از کنترل منفی بیش‌تر است. رقت ۲ mg/ml عصاره آبی - الکلی میوه زرشک همانند رقت چهار میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی زرشک عمل نموده و تمامی پروتواسکولکس‌ها را در عرض پنج دقیقه اول مواجهه از بین برده است. کم‌ترین رقت عصاره آبی - الکلی یعنی ۰/۲۵ mg/ml نیز خاصیت پروتواسکولکس کشی از خود نشان داده است. با توجه به یافته‌های جداول ۱ و ۲ خاصیت پروتواسکولکس کشی در تمام رقت‌ها مشاهده می‌شود. ولی فعالیت پروتواسکولکس کشی با افزایش رقت به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. در کل توان پروتواسکولکس کشی عصاره آبی - الکلی میوه زرشک نسبت به عصاره آبی آن بیش‌تر است. در مورد اثرات عصاره آبی و آبی - الکلی گیاهان دارویی و مواد طبیعی مانند عسل و پروپولیس بر روی پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس نیز نتایج مشابهی مشاهده شده است. در بررسی انجام شده توسط Mahdavi اثر پروتواسکولکس کشی عصاره آبی، الکلی و آلکالوئیدهای تام دانه اسپند *Peganum harmala* بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید مورد بررسی قرار گرفت، نتایج حاکی از این مسئله است که عصاره آبی نسبت به الکلی تاثیر بسیار ناچیزی بر روی پروتواسکولکس‌ها داشته است. هم‌چنین توان پروتواسکولکس کشی آلکالوئیدهای تام دانه اسپند به مراتب بیش‌تر از خاصیت پروتواسکولکس کشی عصاره الکلی آن بوده است.^{۱۴} در بررسی انجام شده توسط Sajjadi اثر عصاره‌های آبی، الکلی و

References

- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003;362(9392):1295-304.
- Torgerson PR, Budke CM. Echinococcosis: An international public health challenge. *Res Vet Sci* 2003;74(3):191-202.
- Budke CM1, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 2006;12(2):296-303.
- Smego RA Jr1, Sebanego P. Treatment options for hepatic cystic echinococcosis. *Int J Infect Dis* 2005;9(2):69-76.
- Ustünsöz B, Akhan O, Kamiloğlu MA, Somuncu I, Uğürel MS, Cetiner S. Percutaneous treatment of hydatid cysts of the liver: long-term results. *AJR Am J Roentgenol* 1999;172(1):91-6.
- Moro PL, Schantz PM. Echinococcosis: historical landmarks and progress in research and control. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100(8):703-14.
- Rajabi MA. Fatal reactions and methaemoglobinaemia after silver nitrate irrigation of hydatid cyst. *Surg Pract* 2009;13(1):2-7.
- Abbassi Dezfuli A, Shishineh P, Shadmehr MB, Ghaffarnejad MH. Early and latest effects of scolical agents on liver and bile ducts: An experimental study. *Iranian J Med Sci* 1991;16(1-2):36-9.
- Prasad J, Bellamy PR, Stubbs RS. Instillation of scolical agents into hepatic hydatid cysts: can it any longer be justified? *N Z Med J* 1991;104(917):336-337.
- Besim H, Karayalçin K, Hamamci O, Güngör C, Korkmaz A. Scolical agents in hydatid cyst surgery. *HPB Surg* 1998;10(6):347-51.
- Sahin M, Eryilmaz R, Bulbuloglu E. The effect of scolical agents on liver and biliary tree (experimental study). *J Invest Surg* 2004;17(6):323-6.
- Pawłowski ZS, Eckert J, Vuitton DA, Ammann RW. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS, editor. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals. Paris: France; 2001. p. 20-68.
- Arayne MS, Sultana N, Bahadur SS. The berberis story: Berberis vulgaris in therapeutics. *Pak J Pharm Sci* 2007;20(1):83-92.
- Mahdavi M, Masood J. Scolical effect of alcoholic, aqueous and total alkaloids of Peganum Harmala L. (Syrian Rue) against hydatid cysts protoscolices. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2002;60(3):215-26.
- Sadjjadi SM, Zoharizadeh MR, Panjeshahin MR. In vitro screening of different Allium sativum extracts on hydatid cysts protoscolices. *J Invest Surg* 2008;21(6):318-22.
- Ghaderi R, Maleki Nejad P. Evaluation of anticandidal effects of Berberis vulgaris root extracts (ethanolic and aqueous) and comparing their effects with those of clotrimazole. *J Birjand Univ Med Sci* 2006;3(2):9-15.
- Kazemi E, Talari SA, Houshyar H. The effect of an alcoholic extract of Berberis Vulgaris on cutaneous Leishmaniasis (L. Major) in BALB/c Mice. *J School Publ Health Inst Publ Health Res* 2007;5(3):35-42.
- Samsam Shariat H. Extraction of Herbal Medicine's Effective Component. 2nd ed. Isfahan: Mani Press; 2007. p. 10-7.
- Ivanovska N, Philipov S. Study on the anti-inflammatory action of Berberis vulgaris root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *Int J Immunopharmacol* 1996;18(10):553-61.
- Dziri C, Haouet K, Fingerhut A. Treatment of hydatid cyst of the liver: where is the evidence. *World J Surg* 2004;28(8):731-6.
- Yorganci K, Sayek I. Surgical treatment of hydatid cysts of the liver in the era of percutaneous treatment. *Am J Surg* 2002;184(1):63-9.
- Buttenschoen K, Carli Buttenschoen D. Echinococcus granulosus infection: the challenge of surgical treatment. *Langenbecks Arch Surg* 2003;388(4):218-30.
- Mottaghian H, Saidi F. Postoperative recurrence of hydatid disease. *Br J Surg* 1978;65(4):237-42.
- Amir-Jahed AK, Fardin R, Farzad A, Bakshandeh K. Clinical echinococcosis. *Ann Surg* 1975;182(5):541-6.
- Martinez Peralta CA. A warning to surgeons who occasionally see hydatid cysts. *Surgery* 1989;105(4):570.
- Caglar R, Yuzbasioglu MF, Bulbuloglu E, Gul M, Ezberci F, Kale IT. In vitro effectiveness of different chemical agents on scolices of hydatid cyst. *J Invest Surg* 2008;21(2):71-5.
- Altindis M, Arikan Y, Cetinkaya Z, Polat C, Yilmaz S, Akbulut G, et al. Octenidine hydrochloride in hydatid disease. *J Invest Surg* 2004;17(1):41-4.
- Sharma U, Velpandian T, Sharma P, Singh S. Evaluation of anti-leishmanial activity of selected Indian plants known to have antimicrobial properties. *Parasitol Res* 2009;105(5):1287-93.
- Kilicoglu B1, Kismet K, Koru O, Tanyuksel M, Oruc MT, Sorkun K, et al. The scolical effects of honey. *Adv Ther* 2006;23(6):1077-83.
- Kismet K, Kilicoglu B, Koru O, Tanyuksel M, Oruc MT, Sorkun K, et al. Evaluation on scolical efficacy of propolis. *Eur Surg Res* 2006;38(5):476-81.

Scolicidal effects of *Berberis vulgaris* fruit extract on hydatid cyst protoscolices

Abstract

Received: 29 Jun. 2013 Accepted: 15 Feb. 2014 Available online: 01 Apr. 2014

Nima Salehi M.Sc.¹
Soheila Rouhani D.V.M.,
Ph.D.^{1*}
Mohammad Kamalinejad
M.Sc.²
Farid Zayeri Ph.D.³
Afshin Motaghifar D.V.M.⁴

1- Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Faculty of Pharmaceutical, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Faculty of Paramedical, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Veterinary, Maysam abattoir, Robatkarim, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Koodak-yar Ave., Daneshjoo Blvd, Evin, Chamran High way, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 23872564
E-mail: srouhani11@sbsmu.ac.ir, srouhani11@yahoo.com

Background: Surgery is one of the best choices for the treatment of hydatidosis. The use of effective scolicidal agents during surgery for hydatid cyst is essential to prevent the secondary infection. Up to now no effective and safe agent has been identified for this purpose. *Berberis vulgaris* called “Zereshk” in Persian has been traditionally used as herbal remedy for the treatment of complaints and it is widely cultivated in Iran. Many studies have shown that it has antibacterial, antifungal and antiparasitic effect.

Methods: In this study the scolicidal effect of *Berberis vulgaris* aqueous and hydro-alcohol extract for different concentrations (for aqueous: 0.5, 1, 2 and 4 mg/ml and for hydro-alcohol: 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/ml) at different exposure times (5, 15 and 30 minutes) was evaluated. For this purpose, we obtained liver hydatid-cysts from a slaughter house. Viability of protoscolices was assessed by 0.1% eosin staining. Normal saline and hypertonic saline were used as negative and positive controls respectively.

Results: All the different concentrations of *Berberis vulgaris* aqueous and hydro-alcoholic extracts had scolicidal effect. An aqueous extract with 4mg/ml concentration acted as positive control and we observed to lead to the death of 100% of protoscolices in the first 5 minutes. The least scolicidal effect (12.3%) was observed in an aqueous extract with 0.5 mg/ml concentration. The scolicidal activity of hydro-alcoholic extract with concentration of 2 mg/ml was 100% after 5 min of application, which was the same as positive control group. We noticed a significant increase in protoscolicidal activity with an increase in concentration in the two extracts of *Berberis vulgaris* ($P<0.001$).

Conclusion: It is important to mention that all the concentration levels and exposure times applied in this experiment are relatively low, since scolitical activity in both of the extracts is at its highest in this low spectrum. For further experiments, we suggest that the stability of cyst fluid in both of the extracts should be assessed. Therefore, after In vivo examination and additional experiments, it may be used as a suitable and effective scolicidal in surgery.

Keywords: berberis vulgaris, echinococcus granulosus, hydatid cyst.