Evaluating the protoscolicidal efficacy of ethanolic extract of Nectaroscordum koelzi root for application in hydatid cyst surgery

Saedi Dezaki E[1], Sharififar F[2], Mahmoudvand H[3], Beiranvand M[4*]

1. Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2. Professor, Herbal and Traditional Medicines Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Associate Professor, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

4. Assistant Professor, Department of Surgery, Shahid Rahimi Hospital, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, Mania.beyranvand@yahoo.com

Received: *2025/5/13* Accepted: *2025/6/20*

Abstract

Background: The present study was designed and conducted to evaluate the protoscoccidial effects of ethanolic extract of *Nectascordeum koelzi* root on hydatid cyst protoscoleces in both *in vitro* and *ex vivo* conditions.

Materials and Methods: Protoscoleces (1×10^3/ml) were incubated with different concentrations of plant extract (2.5, 5, 10, and 20 mg/ml) for different times (5, 10, 20, 30, and 60 minutes). Then, the viability of protoscoleces was determined using 0.1% eosin staining test. The effect of the extract on caspase-3-like enzyme activity was also investigated using a colorimetric method.

Results: By *in vitro* experiments the plant extract at concentrations of 10 and 20 mg/ml caused 100% lethality of protoscoleces after only 10 and 30 minutes of exposure. On the other hand, the *ex vivo* results showed that the extract at similar concentrations was able to induce complete lethality (100%) of protoscoleces after 20 and 60 minutes of exposure, respectively ($p<0.001$). The extract increased caspase-3 activity in protoscoleces in a concentration-dependent manner.

Conclusion: Given its rapid and significant effect on hydatid cyst protoscoleces, this extract can be considered as a promising alternative to conventional chemical scolicides during hydatid surgeries.

Keywords: Scolicidal, Hydatidosis, *Echinococcus granulosus*, Extract.

Citation: Saedi Dezaki E, Sharififar F, Mahmoudvand H, Beiranvand M. Evaluating the protoscolicidal efficacy of ethanolic extract of Nectaroscordum koelzi root for application in hydatid cyst surgery. Yafte. 2025; 27(3):107-117.

***Correspondence Address: Department of Surgery, Shahid Rahimi Hospital, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad.**

Email: Mania.beyranvand@yahoo.com

بررسی کارایی پروتواسکولیسیدال عصاره اتانولی ریشه گیاه پیاز تابستانه با هدف کاربرد در جراحی کیست هیداتید

ابراهیم ساعدی دزکی[1]، فریبا شریفی فر[2]، حسین محمودوند[3]، مانیا بیرانوند[4]*

۱- استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- استاد، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳- دانشیار ، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۴- استادیار، گروه جراحی، بیمارستان شهید رحیمی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

یافته / دوره ۲۷ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۴ / مسلسل ۱۰۵

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۵/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۶/۲۰

مقدمه: مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات پروتوسکولسیدی عصاره اتانولی ریشه گیاه پیاز تابستانه (***Nectascordeum koelzi***) بر روی پروتوسکولکس‌های کیست هیداتید، در دو شرایط آزمایشگاهی (***in vitro***) و بافتی (***ex vivo***) طراحی و اجرا گردیده است.

مواد و روش‌ها: پروتوسکولکس‌ها (۱۰۳ × ۱) با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه (۲،۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، و ۶۰ دقیقه) مواجهه گردید. سپس، میزان زنده‌مانی **(viability)** آنها با استفاده از رنگ‌آمیزی با ائوزین ۰/۱٪ تعیین شد. همچنین اثر عصاره بر فعالیت آنزیم شبه کاسپاز-۳ به روش رنگ‌سنجی استفاده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در شرایط ***in vitro*** عصاره گیاه در غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، پس از تنها ۱۰ و ۳۰ دقیقه مواجهه، موجب کشندگی صد درصدی پروتوسکولکس‌ها شد. از سوی دیگر، نتایج**ex vivo** نشان داد که عصاره در غلظت‌های مشابه به ترتیب پس از ۲۰ و ۶۰ دقیقه مواجهه، قادر به القای کشندگی کامل (۱۰۰٪) پروتوسکولکس‌ها بود (**P<۰/۰۰۱**). عصاره به صورت وابسته غلظت موجب افزایش فعالیت کاسپاز-۳ در پروتواسکولکس ها گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اثرگذاری سریع و قابل توجه آن بر پروتوسکولکس‌های کیست هیداتید، می‌توان این عصاره را به‌عنوان یک گزینه جایگزین امیدوارکننده برای اسکولی‌سیدهای شیمیایی مرسوم در حین جراحی‌های هیداتید مدنظر قرار داد.

واژه‌های کلیدی: اسکولیسیدال، هیداتیدوزیس، اکینوکوکوس گرانولوزوس، عصاره.

***آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، بیمارستان شهید رحیمی، گروه جراحی.**

پست الکترونیک: Mania.beyranvand@yahoo.com

مقدمه

هیداتیدوزیس یکی از بیماری‌های زئونوزی با اهمیت جهانی است که ناشی از مرحله لاروی کرم پهن اکینوکوکوس گرانولوزوس می‌باشد (۱). این بیماری در گستره وسیعی از مناطق جغرافیایی شیوع دارد و در ایران به صورت‌هایپراندمیک مشاهده می‌شود (۲)، که موجب تحمیل خسارات قابل توجه اقتصادی و بهداشتی به جوامع انسانی می‌گردد (۲). سازمان بهداشت جهانی میزان بروز را بیش از ۵۰ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر-سال، شیوع را ۵ تا ۱۰ درصد در مناطق بومی خاص، شیوع را ۲۰ تا ۹۵ درصد در دام‌های ذبح شده و همچنین حدود ۱ میلیون نفر را که در حال حاضر از این بیماری مشترک بین انسان و دام رنج می‌برند، تخمین می‌زند (۳). میزبان نهایی انگل عمدتاً سگ‌ها و سایر اعضای خانواده سگ‌سانان هستند، در حالی که انسان به طور تصادفی و از طریق مصرف آب، سبزیجات یا سایر مواد غذایی آلوده به تخم انگل آلوده می‌شود (۳). فرم بالغ انگل در میزبان اصلی معمولاً تهدید مستقیم برای حیات ندارد؛ اما لاروهای آن در میزبان واسط قادرند با تشکیل کیست‌هایی در بافت‌های مختلف مانند کبد، ریه و مغز، بیماری‌های شدید و حتی مرگبار ایجاد کنند (۳). مراحل اولیه عفونت اغلب بدون علامت هستند، اما با بزرگ‌تر شدن کیست و با توجه به محل استقرار آن، علائم بالینی به تدریج ظاهر می‌شوند. درمان دارویی با داروهای خانواده بنزیمیدازول در مورد کیست‌های کوچک و غیر فعال موثر است، اما برای کیست‌های بزرگ و فعال، جراحی به عنوان بهترین روش درمانی شناخته می‌شود (۴).

یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در جراحی کیست‌های هیداتید، خطر پاره شدن کیست و نشت محتویات آن به بافت‌های اطراف است که می‌تواند منجر به ایجاد کیست‌های ثانویه و عود بیماری شود (۴). به منظور کاهش این خطر، استفاده از مواد اسکولکس‌کش نظیر محلول نمک هایپرتونیک ۲۰ درصد، نقره نیترات و فرمالین در سال‌های اخیر رواج یافته است (۵). با این حال، این ترکیبات می‌توانند عوارض جانبی قابل توجهی از جمله فیبروز مجاری صفراوی، نکروز و سیروز کبدی را به دنبال داشته باشند (۶،۷). بنابراین، نیاز به توسعه ترکیبات جدید اسکولکس‌کش با کارایی بالاتر و عوارض جانبی کمتر همچنان از اولویت‌های تحقیقاتی در این حوزه است. به دلیل اینکه ترکیبات گیاهی معمولاً با بدن سازگاری بیشتری دارند و عوارض کمتری ایجاد می‌کنند، توجه به آن‌ها به عنوان گزینه‌های جایگزین برای داروهای شیمیایی، به ویژه در درمان بیماری‌های انگلی، روز به روز افزایش می‌یابد.

در سال‌های اخیر، فعالیت‌های ضد پروتواسکولکسی تعدادی از گیاهان مختلف مانند آویشن شیرازی، سیاه دانه، زیره سبز، سته وحشی، زرشک و غیره مورد مطالعه قرار گرفته است (۸). با این وجود، به دلیل تفاوت‌های موجود در نتایج پژوهش‌ها و نگرانی‌های مربوط به سمیت احتمالی این محصولات گیاهی، کاربرد بالینی آن‌ها هنوز به طور کامل تایید نشده است (۸). گیاه پیاز تابستانه لرستانی (*Nectascordum koelzi*) از خانواده Liliaceae به عنوان یک از گونه های بومی و نادر ایران می باشد (۹،۱۰)، مطالعات بیولوژیکی اولیه نشان داده‌اند که عصاره‌های مختلف این گیاه دارای فعالیت‌های زیستی متعددی از جمله اثرات ضدباکتری، ضدقارچ، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدانگلی هستند. در بررسی‌های آزمایشگاهی، عصاره متانولی این گیاه توانسته است رشد انگل *Leishmania major* را در شرایط *in vitro* مهار کرده و پاسخ ایمنی میزبان را از طریق افزایش تولید نیتریک‌اکساید در ماکروفاژها تقویت کند. همچنین در مدل‌های *in vivo*، عصاره این گیاه کاهش معنی‌داری در اندازه زخم‌های پوستی ناشی از لیشمانیوز ایجاد کرده است (۱۱،۱۲). با توجه به فعالیت های دارویی به ویژه ضد انگلی گیاه پیاز تابستانه لرستانی در این اثر ضد پروتواسکولکسی عصاره این گیاه را بر روی پروتواسکولکس

هـای کیسـت هیداتیـد در شـرایط *In vitro* و *Ex vivo* مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جمع آوری گیاه

در این مطالعه بخش ریشه گیاه در نـواحی کوهسـتانی شهرستان خرم آباد در فروردین ماه جمع آوری گردیـده و پس از تایید نام علمی و تهیه نمونه هرباریوم (شـماره ۹۳-۲۲۳)، قسـمت هـای جمـع آوری شـده، خشـک و پـودر گردیده و در ظروف تیره نگداری شدند.

عصاره گیری و تهیه عصاره اتانولی

در ابتدا ۳۰۰ گرم از گیاه خرد شـده بـه ۱۰۰۰ میلـی لیتر اتانول و آب مقطر اضافه شده و به مدت ۳ شـبانه روز به آرامی مخلوط گردید تا استخراج به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسـط صـافی از هـم جـدا تـا عصاره اولیه بدست آید. عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء گردیده و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد حلال آنها به مدت یک ساعت به آرامی تبخیـر گردیـده (Heidolph, Germany) و عصاره تغلیظ شده در این مرحلـه بدسـت خواهد آمد (۱۳). میزان عصـاره بدسـت آمـده ۲۶,۴ گـرم معادل ۸,۸ درصد از ماده اولیه گیاه بدست آمد.

تهیه پروتواسکولکس و بررسی میزان زنده مانی (Viability)

ابتدا کبدهای حاوی کیست هیداتید را از گوسـفند آلـوده از کشتارگاه شهر شهرکرد تهیه کـرده و بـه آزمایشـگاه گـروه انگـل شناسـی منتقـل گردیـد. سـپس در شـرایط اسـتریل پروتواسکولکس های مورد نیاز را از کیسـت هـای موجـود در کبد برداشته و به تیوب های استریل منتقل می کنـیم و آنهـا را با نرمال سالین استریل حداقل ۳ بار شستشو می دهـیم. در قدم بعد بـرای محاسـبه ویـابیلیتی آنهـا از آزمـون ائـوزین بـا استفاده از رنگ آمیزی ائوزین ۰/۱٪ (سیگما آلـدریچ، آلمـان) استفاده گردید. در این روش پروتواسکولکس های زنده شـفاف و بدون رنگ و پرتواسکولکس های مرده به رنگ صورتی دیـده می شوند (۱۴). تنها کیسـت هـایی جهـت آزمـایش اسـتفاده شدندکه ویابلیتی آنها بالای ۹۰ درصد باشد.

بررسی اثر ضد انگلی عصاره بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط In vitro

ابتدا چهار غلظت مختلف از عصاره گیـاه شـامل ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گـرم بـر میلی‌لیتـر بـا محلـولی حـاوی پروتواسکولکس (۱۰۳×۱ در هر میلی لیتر) مخلـوط شـدند. سپس در زمان‌هـای مختلـف ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقـه، میزان زنـده مـانی پروتواسـکولکس‌ها انـدازه‌گیری شـد. بـه منظور کنترل آزمایش، از نرمال سـالین اسـتریل بـه عنـوان کنترل منفی و نیترات نقره به عنوان کنترل مثبـت اسـتفاده گردید. لازم به ذکر است که تمامی این آزمایشات به صورت تریپلیکیت و روی پلیت‌های ۴۸ خانه‌ای انجام شـدند (۱۵). تعیـین غلظـت مهـاری ۵۰٪ (Half-maximal inhibitory concentration (IC50)) بـا اسـتفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸,۴,۳ انجام شد.

بررسی اثر ضد انگلی عصاره بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط Ex vivo

در ایـن بخـش از مطالعـه، بـرای ارزیـابی فعالیـت پروتواسکولیسیدال عصاره گیاه پیاز تابستانه در شـرایط خـارج از بدن (ex vivo)، از کبد گوسفندانی استفاده شد کـه بـه طـور طبیعی به کیست هیداتید آلـوده بودنـد. در ابتـدا، بـیش از ۵۰ درصـد از مـایع داخـل کیسـت‌ها بـه منظـور اسـتخراج پروتواسکولکس‌ها آسپیره شد و زنده بودن آن‌هـا بـا اسـتفاده از آزمون ۰,۱٪ ائوزین تأیید گردید. برای هر یک از چهـار غلظـت عصاره (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بـر میلی‌لیتـر) سـه کیسـت انتخاب شد. عصاره به داخـل کیسـت تزریـق گردیـد تـا سـطح داخلی آن کاملاً پر شود. سپس در فواصـل زمـانی ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه نمونه‌هایی از مایع کیست برداشته و با رنگ ائـوزین ۰,۱٪ مخلوط شدند. پس از ۱۰ دقیقـه، از پروتواسـکولکس‌های باقی‌مانده اسمیری تهیـه و روی لام شیشـه‌ای قـرار گرفتنـد تـا میزان زنده ماندن آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسـی

شود (۱۴). علاوه بر این از نیترات نقره و نرمال سالین به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. تعیین غلظت مهاری ۵۰٪ (Half-maximal inhibitory concentration (IC50)) با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸,۴,۳ انجام شد.

ارزیابی فعالیت شبه کاسپاز-۳ (Caspase-3) در پروتواسکولکس های کیست هیداتید

فعالیت کاسپاز-۳ با بهره‌گیری از کیت تجاری موجود (Sigma-Aldrich، آلمان) و بر اساس پروتکل سازنده مورد ارزیابی قرار گرفت. این آنالیز مبتنی بر سنجش اسپکتروفتومتریک رهاسازی مولکول pNA از سوبستراهای اختصاصی کاسپاز-۳ (pNA-DEVD-Ac) است که نشانگر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم می‌باشد. پس از ۴۸ ساعت قرارگیری پروتواسکولکس‌ها در حضور عصاره، نمونه‌ها تحت سانتریفیوژ اولیه در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. رسوب حاصل لیز شده و با سانتریفیوژ ثانویه به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰ rpm جداسازی شد. ۵ میکروگرم از سوپرانتان به همراه ۸۵ میکرولیتر بافر واکنش و ۱۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی کاسپاز-۳ ترکیب و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader اندازه‌گیری و نشان‌دهنده میزان فعالیت کاسپاز-۳ بود (۱۵).

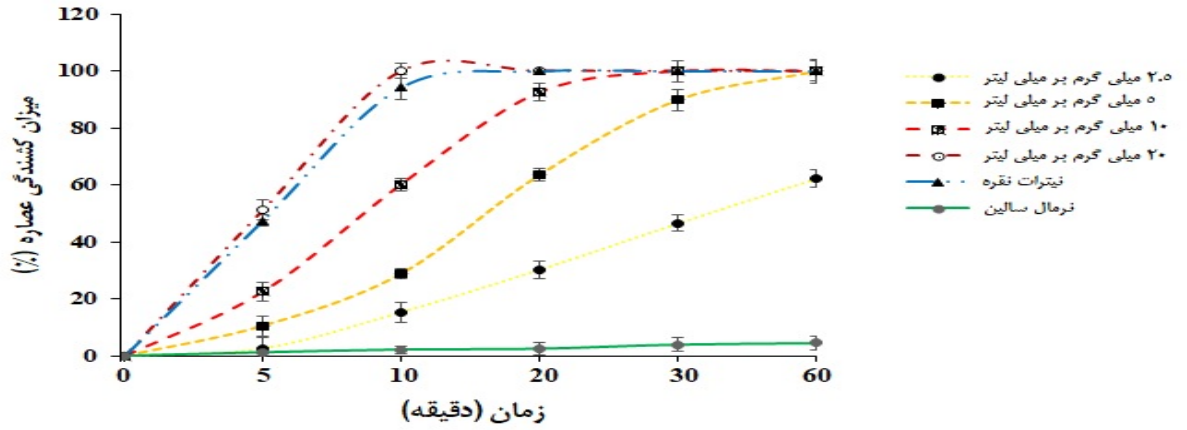
آنالیز داده ها

پس از گردآوری داده‌ها، تحلیل اولیه با بهره‌گیری از آمار توصیفی شامل محاسبه شاخص‌های مرکزی (میانگین، میانه) و شاخص‌های پراکندگی (انحراف معیار، دامنه) جهت توصیف ویژگی‌های کمی داده‌ها انجام گرفت. به منظور بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف معنادار، آزمون‌های تعقیبی Tukey و Post-hoc جهت مقایسه‌های زوجی به کار گرفته شدند. کلیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ و به صورت دوطرفه (two-tailed) انجام شد. سطح معنی‌داری آماری برابر با $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر ضد انگلی عصاره بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط In vitro

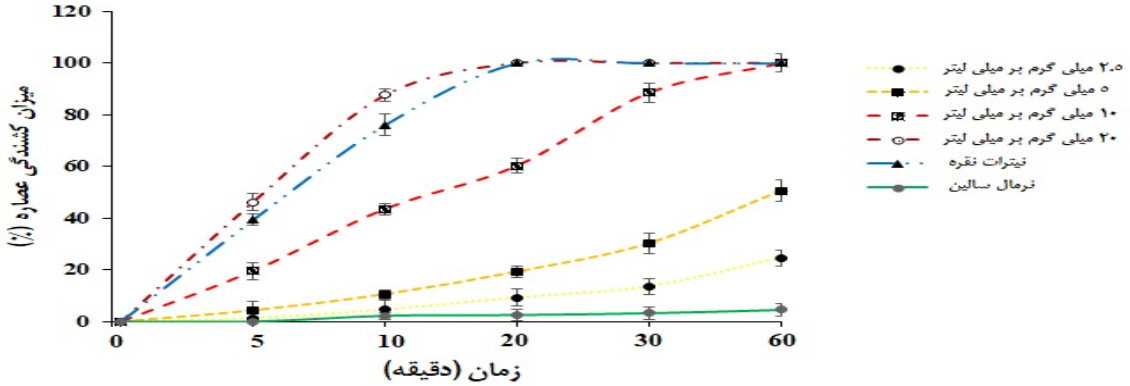
یافته‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند که عصاره در همه غلظت های مورد آزمایش قادر است پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید را بصورت وابسته به زمان از بین ببرد. نتایج کلی نشان می‌دهند که عصاره در سطوح مختلف غلظتی (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری ($P<۰,۰۰۱$) میزان بقای پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک را نسبت به کنترل منفی (نرمال سالین) کاهش می‌دهد، که این یافته‌ها در شکل ۱ به وضوح مستند شده است. عصاره در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر، قادر بود با مکانیسمی مؤثر، پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک را طی ۱۰ دقیقه تماس مستقیم به طور کامل از بین ببرد. در مقابل، غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۰ و ۳۰ دقیقه مواجهه، به ترتیب منجر به تخریب ۹۲/۶٪ و ۱۰۰٪ پروتواسکولکس‌ها گردید که بیانگر وابستگی اثرات سیتوتوکسیک عصاره به غلظت و زمان تماس است. در میان غلظت‌های مورد ارزیابی، غلظت ۲,۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر پایین‌ترین میزان بقای پروتواسکولکس‌ها را به همراه داشت و پس از ۶۰ دقیقه مواجهه باعث کاهش ۶۲,۳٪ زنده‌مانی آن‌ها شد. همچنین، مقادیر IC۵۰ عصاره در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۲۲/۱۲، ۸/۰۲، ۵/۳۹، ۲/۷۸و ۲/۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید که نشان‌دهنده افزایش اثر سیتوتوکسیک با طولانی‌تر شدن زمان تماس است.



شکل ۱. بررسی اثر ضد انگلی غلظت های مختلف عصاره بر پیاز تابستانه بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط In vitro پس از ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه زمان مواجهه با روش سنجش رنگ آمیزی ائوزین. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (N = ۳) بیان شده‌اند.

بررسی اثر ضد انگلی عصاره بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط Ex vivo

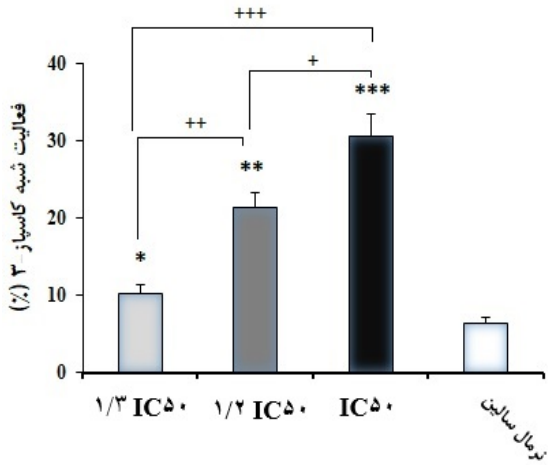
عصاره در شرایط خارج از بدن (ex vivo) نشان‌دهنده فعالیت ضد انگلی پایدار و در عین حال طولانی‌مدتی است که با اثرات سریع و کشنده مشاهده شده در آزمایشگاه تفاوت دارد. نتایج نشان می‌دهد که در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر، عصاره توانایی از بین بردن کامل پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید را پس از ۲۰ دقیقه تماس مستقیم داراست. در مقابل، غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر، پس از ۶۰ دقیقه مواجهه، موجب کاهش ۱۰۰٪ بقای پروتواسکولکس‌ها گردید. پایین‌ترین میزان فعالیت کشندگی در میان غلظت‌های ارزیابی شده به ۲,۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر اختصاص داشت که پس از ۶۰ دقیقه منجر به کاهش تنها ۲۴/۶٪ جمعیت پروتواسکولکس‌ها شد. داده‌های آماری نشان می‌دهد که غلظت‌های مورد آزمایش به طور قابل توجهی ($P<0/001$) نرخ مرگ و میر پروتواسکولکس‌ها را نسبت به گروه کنترل (نرمال سالین) افزایش می‌دهند، که این روند در شکل ۲ به وضوح قابل مشاهده است. همچنین، IC_{50} عصاره در فواصل زمانی ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب بیش از ۲۵/۵۱، ۱۱/۴۶، ۸/۲۹، ۵/۶۴ و ۴/۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شده است که حاکی از افزایش اثربخشی با افزایش مدت مواجهه می‌باشد.



شکل ۲. بررسی اثر ضد انگلی غلظت های مختلف عصاره بر پیاز تابستانه بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط ex vivo پس از ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه زمان مواجهه با روش سنجش رنگ آمیزی ائوزین. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (N = ۳) بیان شده‌اند.

ارزیابی فعالیت شبه کاسپاز-۳ در پروتواسکولکس ها پس از مواجهه با عصاره

شکل ۳ تأثیرات غلظت‌های مختلف عصاره بر فعالیت آنزیم شبه کاسپاز-۳ در پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید را نمایش می‌دهد. غلظت‌های عصاره معادل یک‌سوم IC۵۰ ، نیمه IC۵۰ و مقدار IC۵۰، به طور معناداری ($P<۰/۰۰۱$) موجب افزایش فعالیت کاسپاز-۳ به ترتیب به میزان ۱۰/۳٪، ۲۱/۴٪ و ۳۰/۶٪ گردیدند. این نتایج نشان‌دهنده وابستگی مثبت فعالیت آنزیمی به غلظت عصاره است که می‌تواند نقش مهمی در مکانیسم القای آپوپتوز پروتواسکولکس‌ها ایفا نماید.



شکل۳. ارزیابی فعالیت شبه کاسپاز-۳ پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف عصاره پیاز تابستانه با استفاده از سنجش پروتئاز رنگ‌سنجی. مقدار IC۵۰، نشان دهنده غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰٪ از هدف. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (N = ۳) بیان شده‌اند.

+: $P<۰,۰۵$ ++: $P<۰/۰۱$ +++: $P<۰,۰۰۱$ اختلاف معنی دار بین گروه ها

***: $P<۰,۰۵$ **: $P<۰,۰۱$ ***: $P<۰,۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل نرمال سالین**

بحث و نتیجه‌گیری

از دیرباز، استفاده از محصولات طبیعی به‌ویژه گیاهان دارویی جهت درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های عفونی، مورد توجه جوامع بشری قرار داشته است. گیاهان دارویی به دلیل دسترسی آسان، هزینه کم، سمیت پایین و کارایی مناسب، به عنوان گزینه‌های درمانی مؤثر و مطلوب مطرح شده‌اند (۸). بیماری هیداتیدوز، به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز در جهان و به ویژه در ایران، سالانه خسارات اقتصادی قابل توجهی بالغ بر ۲۰۰ میلیون دلار به کشور وارد می‌کند (۲). درمان جراحی تاکنون به عنوان روش استاندارد و مؤثر در کنترل این بیماری شناخته شده است؛ اما این روش با وجود مزایای فراوان، همراه با خطرات و عوارضی نظیر پارگی یا نشت کیست، شوک آنافیلاکسی و احتمال عود مجدد بیماری در بیمار است (۳). برای کاهش این عوارض، جراحان به منظور از بین بردن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در حین عمل، از مواد شیمیایی پروتواسکولکس‌کش مانند محلول هیپرتونیک نمک ۲۰٪، نیترات نقره ۲۰٪، بتادین، الکل و سایر ترکیبات استفاده می‌کنند. با این وجود، استفاده از این مواد اغلب با عوارض جانبی جدی همچون فیبروز مجاری صفراوی و نکروز کبد همراه است که سلامت بیمار را به خطر می‌اندازد (۴-۷). در این راستا، جستجوی عوامل جدیدی که همزمان از اثربخشی بالا، دسترسی مناسب و سمیت کمتر برخوردار باشند، اهمیت ویژه‌ای یافته است. در مطالعه حاضر اثر ضد پروتواسکولکسی عصاره گیاه پیاز تابستانه در شرایط In vitro و Ex vivo بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق می‌تواند گامی موثر در جهت توسعه درمان‌های ایمن‌تر و کارآمدتر جهت کنترل بیماری هیداتیدوز باشد.

یافته‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند که عصاره در همه غلظت های مورد آزمایش قادر است پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید را بصورت وابسته به زمان از بین ببرد. نتایج کلی نشان می‌دهند که عصاره در سطوح مختلف غلظتی (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری میزان بقای

پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک را نسبت به کنترل منفی (نرمال سالین) کاهش می‌دهد، که این یافته‌ها در شکل ۱ به وضوح مستند شده است. عصاره در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر، قادر بود با مکانیسمی مؤثر، پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک را طی ۱۰ دقیقه تماس مستقیم به طور کامل از بین ببرد.

مطالعه‌ای منتشرشده در سال ۲۰۲۳ نشان داد عصاره متانولی N. koelzi به‌تنهایی یا همراه با مگلومین آنتیمونی، در برابر فرم آماستیگوت Leishmania major نتیجه مؤثری دارد. مقدار IC_{50} عصاره در عملکرد ضد انگلی حدود ۱۷،۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود ($P<0/001$). این عصاره با دوز ۱۰۰ میلی گرم برکیلوگرم در کنار ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم مگلومین آنتیمونی، پس از ۲۸ روز درمان منجر به بهبود کامل ضایعات جلدی در موش‌ها شد (۱۲). مطالعه‌ای که توسط محمودوند و همکاران انجام شد، نشان داد که عصاره متانولی گونه دیگری از این جنس یعنی N. tripedale در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، قادر است به‌طور کامل پروتوسکولکس‌های Echinococcus granulosus را به ترتیب در مدت‌زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه از بین ببرد (۱۶). تفاوت‌های مشاهده‌شده میان این دو تحقیق می‌تواند به عوامل متعددی نسبت داده شود، از جمله نوع و روش تهیه عصاره، منطقه جغرافیایی و شرایط اقلیمی محل جمع‌آوری گیاه، گونه انگل مورد استفاده، مرحله زیستی آزموده‌شده از انگل (پروتوسکولکس یا آماستیگوت)، و همچنین غلظت‌های به‌کاررفته از عصاره (۱۲،۱۶). بر اساس مطالعات فیتوشیمیایی پیشین که بر روی عصاره N. koelzi انجام شده است، حضور ترکیبات فعالی نظیر ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و اسیدهای چرب به‌وضوح گزارش شده است (۱۷). این ترکیبات گیاهی به‌ویژه ترپنوئیدها، دارای مکانیسم‌های متنوعی در القای اثرات ضد میکروبی هستند. شواهد پژوهشی نشان می‌دهد که ترپنوئیدها از طریق تخریب ساختار غشای سلولی، نفوذ به درون سلول و ایجاد اختلال در عملکرد اندامک‌های حیاتی مانند میتوکندری، مهار سنتز DNA، و تداخل در مسیرهای زیستی سنتز اسیدهای چرب، می‌توانند منجر به مرگ سلول‌های میکروبی و انگلی شوند (۱۹، ۱۸).

پدیده آپوپتوز به‌دلیل نقش دوگانه‌ای که در تعامل میان میزبان و کیست هیداتید ایفا می‌کند، مورد توجه قرار گرفته است؛ به‌گونه‌ای که می‌تواند هم به نفع بقای انگل و هم به نفع مهار آن عمل کند (۲۰). این فرآیند پیچیده، از طریق فعال‌سازی مجموعه‌ای از آنزیم‌های کلیدی، از جمله کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹، هدایت می‌شود. این آنزیم‌ها نقش محوری در پیشبرد آپوپتوز دارند، به‌ویژه در مراحل نهایی مانند قطعه‌قطعه شدن DNA، چگالی کروماتین و سایر تغییرات مورفولوژیکی مشخص‌کننده مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (PCD) که مشخصه این مسیر مرگ سلولی است (۲۰). غلظت‌های عصاره معادل یک‌سوم IC_{50}، نیمه IC_{50} و مقدار IC_{50} ، به طور معناداری ($P<0/001$) موجب افزایش فعالیت کاسپاز-۳ به ترتیب به میزان ۱۰/۳٪، ۲۱/۴٪ و ۳۰/۶ ٪گردیدند. این نتایج نشان‌دهنده وابستگی مثبت فعالیت آنزیمی به غلظت عصاره است که می‌تواند نقش مهمی در مکانیسم القای آپوپتوز پروتواسکولکس‌ها ایفا نماید. در نتیجه، منطقی است که پیشنهاد کنیم استفاده از عصاره گیاه پیاز تابستانه ممکن است با موفقیت آپوپتوز را آغاز کند و در نتیجه منجر به حذف پروتواسکولکس ها شود.

نتایج مطالعه حاضر تأیید می‌کند که گیاهان دارویی از جمله پیاز تابستانه، به‌عنوان منابع طبیعی ارزشمند، دارای ظرفیت درمانی قابل توجهی در مدیریت بیماری‌های عفونی هستند. بررسی اثرات عصاره گیاه پیاز تابستانه نشان داد که این ترکیب گیاهی در شرایط in vitro و ex vivo دارای فعالیت پروتوسکولسیدی مؤثری علیه

کیست هیداتید می‌باشد. با توجه به اثرگذاری سریع و قابل توجه آن بر پروتوسکولکس‌های کیست هیداتید، می‌توان این عصاره را به‌عنوان یک گزینه جایگزین امیدوارکننده برای اسکولیسیدهای شیمیایی مرسوم در حین جراحی‌های هیداتید مدنظر قرار داد. با این حال، انجام مطالعات تکمیلی شامل ارزیابی سمیت، کارایی در مدل‌های حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی برای تأیید ایمنی و اثربخشی آن ضروری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از افرادی که به هر نحوی در جمع آوری داده ها مشارکت داشتند، تشکر و قدردانی مینمایند .

تعارض منافع

نویسندگان اظهار میدارند که هیچگونه تعارض منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

حمایت مالی

این طرح پژوهشی با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با کد ۹۳/۲۲۳ به ثبت رسیده است

مشارکت نویسندگان

ابراهیم ساعدی دزکی و مانیا بیرانوند طراحی علمی مطالعه، حسین محمودوند و فریبا شریفی فر گردآوری و تجزیه تحلیل دادهها، ابراهیم ساعدی دزکی و حسین محمودوند انجام آزمایشات، ابراهیم ساعدی دزکی و مانیا بیرانوند نگارش مقاله، اصلاح و تایید نهایی مقاله را انجام داده اند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این پژوهش در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی کرمان با کد ۹۳/۲۲۳ به تصویب رسید.

References

1. Andrabi A, Tak H, Rasool A. Hydatidosis: a review. International Journal of Scientific and Technology Research. 2020; 9: 4664-71.
2. Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Writing Panel for the WHO-IWGE Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Tropica 2010; 114(1): 1-16.
3. Hogea MO, Ciomaga BF, Muntean MM, Muntean AA, Popa MI, Popa GL. Cystic Echinococcosis in the Early 2020s: A Review. Trop Med Infect Dis. 2024 Jan 31;9(2):36. doi: 10.3390/tropicalmed9020036. PMID: 38393125; PMCID: PMC10891927.
4. Junghanss T, da Silva AM, Horton J, et al. Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2008; 79(3): 301-311.
5. Sahin M, Eryilmaz R, Bulbuloglu E. The effect of scolicidal agents on liver and biliary tree (experimental study). Journal of Investigative Surgery 2004; 17(6):323-6.
6. i Gavara CG, López-Andújar R, Ibáñez TB, Ángel JM, Herraiz ÁM, Castellanos FO, Ibars EP, Rodríguez FS. Review of the treatment of liver hydatid cysts. World journal of gastroenterology: WJG. 2015;21(1):124.
7. Mijiti W, Wang X, Jia Q, Li Y, Zhou Z, Reheman T, Ayiheng Y, Dong S, Xie Z. Challenges and pitfalls in managing lumbosacral hydatid disease: Lessons learned from clinical practice. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2024 Dec 1;110(4):116542.
8. Salimikia I, Hakami M, Shahmoradi MK. Iranian herbal medicines against hydatid cyst protoscoleces: a systematic review. Infectious Disorders-Drug TargetsDisorders). 2021; 21(5): 38-44.
9. Kendler BS. Garlic (Allium sativum) and onion (Allium cepa): a review of their relationship to cardiovascular disease. Preventive Medicine. 1987;16(5):670-85.
10. Khaksarian M, Hamidikia E, Sepahvand M, Farzan B. Antinociceptive effects and acute toxicity of Nectaroscordum koelzi extract in mice. Entomology and Applied Science Letters. 2019;6(3-2019):9-14.
11. Khaksarian M, Hasanvand KH, Alipour M, Mahmoudvand H, Naizi M, Nadri S. Effect of Nectaroscordum koelzi methanolic extract on acute and chronic inflammation in male mice. Current Drug Discovery Technologies. 2021;18(4):525–31.
12. Alizadegan F, Aghaei M, Kumar SJ, Saadatmand M, Kumar SA. In vitro and in vivo antileishmanial effects of Nectaroscordum koelzi extract against Leishmania major. Journal Parasitic Diseases. 2023; 47: 683–8.
13. Mahmoudvand H, Sepahvand P, Jahanbakhsh S, Azadpour M. Evaluation of the antileishmanial and cytotoxic effects of various extracts of garlic (Allium sativum) on Leishmania tropica. Journal of Parasitic Diseases. 2016; 40: 423-6.

14. Shakibaie M, Khalaf AK, Rashidipour M, Mahmoudvand H. Effects of green synthesized zinc nanoparticles alone and along with albendazole against hydatid cyst protoscoleces. Annals of Medicine and Surgery (Lond). 2022; 78: 103746.
15. Amirafshari H, Khazaal RM, Marzban A, Cheraghipour K, Masoori L, Sepahvand A, Mahmoudvand H. Therapeutic effects of zinc oxide nanoparticles encapsulated within chitosan-camphor against hydatid cysts through suppressing oxidative stress, inflammation, and DNA damage. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2025; 188: 118128.
16. Mahmoudvand H, Ezatpour B, Rashidipour M, Mirbadie SR, Mahmoudvand H. Evaluation of the scolicidal efects of Nectaroscordum tripedale extract and its acute toxicity in mice model. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 2016;29(6): 2125–2128.
17. Zarabi S, Ahmadi S, Rostami R. Anticancer activity evaluation of methanolic extract of Allium Jesdianum and Nectaroscordeum Coelzi against HeLa and K562 cell lines. Yafte. 2017;19(1).
18. Ezatpour B, Azami M, Motamedi M, Rashidipour M, Mahmoudvand H, Alirezaei M et al (2016) Chemical composition, in vitro antibacterial and cytotoxicity effect of Nectaroscordum tripedale extract. Herbal Medicine Journal 5:29–36.
19. Ismail A, Lamia H, Mohsen H, Samia S, Bassem J (2013) Chemical composition and antifungal activity of three Anacardiaceae species grown in Tunisia. Science International 1(5):148–154.
20. Paredes R, Jimenez V, Cabrera G, Iragüen D, Galanti N. Apoptosis as a possible mechanism of infertility in Echinococcus granulosus hydatid cysts. Journal of Cellular Biochemistry. 2007;100(5):1200-9.