نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز، دوره ۳، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۳- صفحات ۲۱۰-۲۰۵

بررسی تأثیر کشندگی غلظت‌های مختلفی از عصاره ریشه گیاه انار *(Punica granatum L.)* بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک در شرایط آزمایشگاهی

محمد زیبایی[1]، بهناز ساجدی[2*]، زهره جعفری[3]

[1] *گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران*
[2] *گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، اراک، ایران*
[3] *گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی (مجتمع قائم مقام فراهانی قنات)، اراک، ایران*

***نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، اراک، ایران
۰۹۱۶-۶۶۷۰۴۳۵
E-mail: behnaz.sajedi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۸

چکیده

مقدمه: بیماری کیست هیداتید توسط گونه‌های *اکینوکوکوس* ایجاد و از آلودگی‌های مهم مشترک بین انسان و حیوانات در کشور ما به شمار می‌رود. درمان بیماری کیست هیداتید اساسا جراحی می‌باشد که همراه یک درمان دارویی انجام می‌شود.استفاده از عوامل مؤثر پروتواسکولکس-کش در حین عمل، برای کاهش احتمال برگشت بیماری، ضروری است. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات ضدپروتواسکولکسی عصاره متانلی ریشه گیاه انار در شرایط آزمایشگاهی، با توجه به بومی بودن این گیاه و اثرات ضد میکروبی متنوع آن، بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بود.

مواد و روش‌ها: مایع موجود درون کیست هیداتید، از کبد گوسفندان آلوده که محتوی پروتواسکولکس‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* بوده، با استفاده از سرنگ تخلیه و تغلیظ می‌گردد و تعداد پروتواسکولکس‌ها در گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب عبارتند از غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱و ۰/۰۰۱درصد عصاره متانولی ریشه انار و نرمال سالین ۰/۹درصد (به‌عنوان شاهد) تعیین می‌شود. پس از جمع آوری اطلاعات و تجزیه تحلیل آنها، به کمک نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) نتایج در قالب جدول‌ها و نمودار آماری ارائه می‌شود.

یافته ها: ۵۰ کبد آلوده مورد بررسی قرار گرفت. در میان عصاره‌های تست شده، غلظت‌های ۰/۱٪ اثرات ضد پروتواسکولکسی قوی در ۶ ساعت داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: ریشه انار می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضد پروتواسکولکسی در درمان کیست هیداتید بکار رود.

کلمات کلیدی: *اکینوکوکوس گرانولوزوس*، انار، پروتواسکولکس کشی

مقدمه

بیماری کیست هیداتید یکی از خطرناکترین بیماری‌های قابل انتقال و مشترک بین انسان و حیوان می باشد که به واسطه انگلی به نام *اکینوکوکوس گرانولوزوس (Echinococcus granulosus)* ایجاد می‌شود.[5] اکینوکوکوس کوچکترین کرم پهن نواری و دارای ۳ تا ۴ بند یا حلقه می‌باشد که بندهای آخر دارای تعداد زیادی تخم هستند. انگل در روده سگ به‌صورت کرم کامل (میزبان اصلی و نهایی) و در حیوانات دیگر در ارگان‌هایی غیر از روده، به‌صورت کیست هیداتید نمایان می‌گردد. علفخواران میزبان واسط اصلی هستند و انسان، بطور اتفاقی به مرحله لاروی آن (به عنوان میزبان واسط غیرفعال) مبتلا می‌شود. در واقع تخم‌های اکینوکوکوس در مدفوع میزبان اولیه رها شده و از طریق آب، سبزیجات، علوفه و امثال آنها توسط میزبان واسط خورده شده و بدین وسیله باعث انتشارعفونت در میان سایر جانداران نیز می‌گردد.[5و9و12] بیماری تقریباً در تمامی‌نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا، خصوصا نواحی که ارتباط نزدیکی بین انسان و سگ وجود دارد، به وفور دیده می‌شود. مطالعات اخیر در مورد فراوانی بیماری در ایران، نشان می‌دهد که بیشترین میزان شیوع این بیماری از مناطق کوهپایه ای-

Archive of SID

www.SID.ir

کوهستانی گزارش شده است، براساس مطالعات انجام شده برروی بیماران در بیمارستان‌ها، برآورد می‌شود از هر ۱۰۰ هزار نفر ۱۲/۱ نفر مبتلا به هیداتیدوز باشند.[۷و۸] میزان آلودگی سگ‌ها در استان‌های اصفهان، مازندران، آذربایجان غربی و ایلام بین ۴۵ تا ٪۶۳ و در سایر نواحی بطور متوسط ٪۲۰ بوده است (در سیستان و بلوچستان حدود ٪۳/۳)[۳و۴و۹] روش‌های درمانی متداول شامل درمان جراحی (آسپیراسیون مایع کیست) و درمان دارویی است. از روش‌های دارو درمانی می‌توان به مواردی چون استعمال H2O2 پس از تخلیه کیست و یا تجویز داروهای خوراکی چون مبندازول و آلبندازول پس از اتمام جراحی اشاره کرد.[۱] در سال‌های اخیر،شواهدی مبنی بر وجود مواد طبیعی ضد اسکولکس در برخی گیاهان به دست آمده است، این گیاهان اثرات ضد میکروبی با طیف وسیع دارند و ممکن است بتوانند به جای مواد صناعی دارویی مورد استفاده قرار بگیرند.[۲و۳و۱۲] خاستگاه گیاه انار *Punica granatum L.* ایران می‌باشد و ایرانیان از ۳ هزار سال پیش با این گیاه آشنایی داشته اند، از میوه‌های بهشتی شمرده شده است و ۳ بار در قرآن بکار رفته است. انار درخت کوچکی است و متعلق به کوچکترین تیره گیاهی یعنی انارسانان (Punicaceae)، گونه *P. granatum* و با نام علمی *Punica granatum* می‌باشد. انار دارای خواص متعددی از جمله اثرات ضد انگلی می‌باشد.[۲و۳و۱۱] قسمت‌های مختلف درخت انار مخصوصاً پوست ریشه و ساقه انار دارای آلکالوئیدی بنام پله تیه رین Pelletierin است. پله تیه رین به صورت مایعی با واکنش قلیایی قوی است ، خاصیت انگل کشی پوست ریشه و ساقه را به این ماده نسبت می دهند. آلکالوئیدهای موجود در پوست ریشه گیاه، به حالت ترکیب با تانن است در نتیجه قابلیت جذب از راه مخاط ندارد و یا به مقدار بسیار کم جذب می‌شود، در نتیجه منحصرا بر روی کرم‌ها اثر می‌کند.[۱۱] لذا با در نظر گرفتن مزیت‌های ذکر شده در بالا و اثرات جانبی داروهای کنونی، این مطالعه با هدف استفاده از درمان جایگزین مناسب‌تر، بی‌خطرتر و ارزان‌تر، انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از نوع مطالعات مداخله‌ای می‌باشد. مواد و ابزار به کار رفته: نرمال سالین ٪۰/۹ ، رنگ ائوزین ٪۰/۱، آب مقطر، پارچه تنظیف، فیلتر با سوراخ‌هایی با قطر ۰/۱ میکرومتر، ست تشریح، ظروف شیشه ای مانند ارلن، شیشه ساعت، پیپت، ویال پلاستیکی، پلیت کشت سلول، لام نئوبار و لامل، سمپلرهای ۲۰۰ میلی‌لیتر، ۵۰ میلی‌لیتر، ۲۵ و ۱۰ میلی‌لیتر و سر سمپلرهای مربوطه، سرنگ استریل و دستکش یکبار مصرف، آسیاب برقی، ترازو، دستگاه فیلتراسیون میلی‌پور، تجهیزاتی مانند میکروسکوپ، انکوباتور، یخچال و شیکر.

حجم و نوع نمونه‌ها و نحوه نمونه برداری: ۵۰ کبد آلوده به کیست هیداتید گوسفندی از کشتارگاه ها در سطح استان لرستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی لرستان منتقل شد.

جمع‌آوری پروتواسکولکس‌ها

با استفاده از سرنگ استریل، مایع کیست هیداتید حاوی پروتواسکولکس، خارج و سه مرتبه با محلول فسفات بافر (PBS) با pH: 7.2 شستشو داده شد. با استفاده از محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم رقت محلول حاوی پروتواسکولکس را طوری تنظیم نموده که به ازای هر میلی لیتر از محلول، $10^3 \times 5$ پروتواسکولکس با توانایی بیش از ۹۰ درصد زنده بودن داشته باشند (به کمک مشاهده زیرمیکروسکوپ و لام هموسیتومتر).

ارزیابی زنده بودن (Viability)

پس از افزودن ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگی ائوزین٪۰/۱ به ۱۰ میلی لیتر مایع کیست هیداتید حاوی پروتواسکولکس، پس از گذشت ۱۵ دقیقه بطور میکروسکوپی زنده بودن پروتواسکولکس‌ها را ارزیابی می‌نمائیم. پروتواسکولکس‌هایی که رنگ ائوزین را به خود جذب نموده و رنگی دیده می‌شوند به عنوان مرده و پروتواسکولکس‌های بی‌رنگ به‌صورت زنده گزارش می‌شوند.

ریشه‌های گیاه انار در بهمن ماه ۱۳۹۱ از انارستان‌های منطقه رومشکان شهرستان کوهدشت لرستان جمع آوری و در شرایط آزاد (هوازی) و در سایه بطور کامل خشک شده و برای انجام عملیات عصاره گیری و آزمایشگاهی آماده گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

عصاره گیری: به ۱۰ گرم از پودر خشک ریشه گیاه، ۱۰۰ میلی‌لیتر متانل ۸۰٪ افزوده و یک غلظت ۱۰ درصد وزنی- حجمی (w/v) درست می‌نماییم و روی بن ماری شیکر دار ۷۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری می‌نماییم. سپس با استفاده از پارچه تنظیف آنرا صاف نموده، ذرات بزرگ‌تر را جدا نموده و با استفاده از دستگاه فیلتراسیون میلی پور آنرا از فیلتر با سوراخ‌هایی با قطر ۰/۲ میکرومتر عبور می‌دهیم. محصول حاصل در شرایط درجه حرارت اتاق فرآوری و در دمای C ۴° نگهداری می‌گردد.[۶و۱۰]

روش اجرای آزمایش

تعداد پروتواسکولکس‌ها درگروه‌های تیماری زیر تعیین می‌شود: گروه‌های ۱،۲ و۳ عبارتند از غلظت‌های ۰/۱و ۰/۰۱و ۰/۰۰۱درصد عصاره متانلی ریشه گیاه انار و گروه ۴ نرمال سالین ۰/۹ درصد به‌عنوان شاهد.عصاره‌ها به چاهک های پلیت کشت سلول محتوی پروتواسکولکس‌ها اضافه می‌شوند و پس از زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت، زیر میکروسکوپ بررسی می‌شوند.مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری و شمارش پروتواسکولکس های زنده و مرده صورت می‌گیرد. بدین ترتیب که پروتواسکولکس‌های رنگ گرفته و قرمز به عنوان مرده و پروتواسکولکس‌های رنگ نگرفته، به عنوان زنده گزارش می‌شوند.

پس از جمع‌آوری اطلاعات و وارد کردن در نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰)، نتایج در قالب شکل‌های آماری مناسب گزارش شد و با توجه به نیاز به ارتباط سنجی، آزمون‌های مختلف آماری نظیر ANOVA و Chi square انجام و در سطح معناداری P<۰/۰۵ ارزیابی گردید.

یافته‌ها

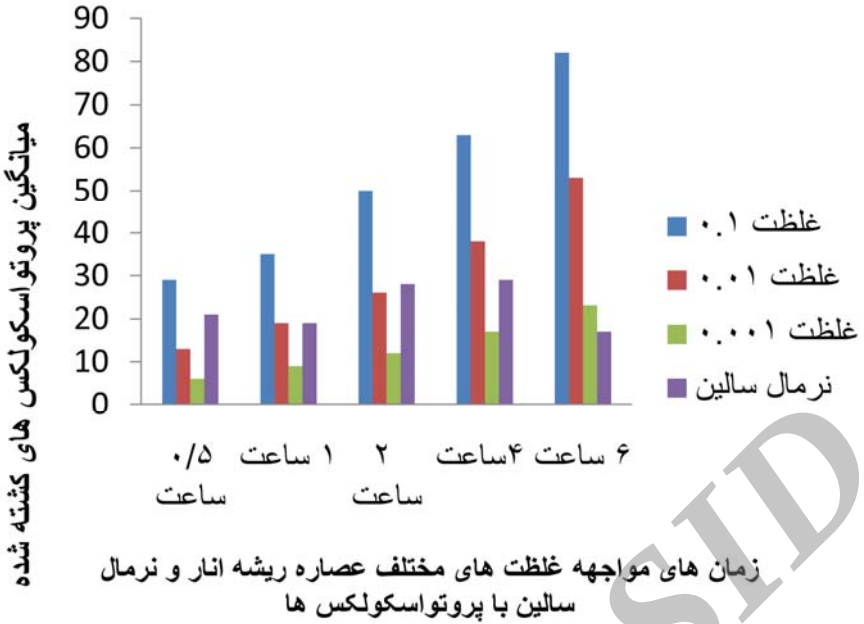
میزان کشندگی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید پس از تماس با غلظت‌های مختلف عصاره ریشه انار در مدت زمان‌های متفاوت اندازه‌گیری شد که در جداول این نتایج به تفصیل بیان شده است.

جدول ۱: مقایسه میانگین تعداد پروتواسکولکس‌های کشته شده در غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های مختلف پس از تزریق

زمان بعد از مواجهه	غلظت عصاره	تعداد پروتو اسکولکس‌های کشته شده میانگین±انحراف معیار	آماره F	P-Value
۳۰ دقیقه	۰/۱	۲۹/۲±۲۲/۴	۵/۹۴	*۰/۰۰۹
	۰/۰۱	۱۳/۱±۷/۸		
	۰/۰۰۱	۶±۲/۷		
۱ ساعت	۰/۱	۳۴/۵±۲۲/۱	۶/۷۸	*۰/۰۰۵
	۰/۰۱	۱۹/۴±۸/۹		
	۰/۰۰۱	۹/۴±۱/۷		
۲ ساعت	۰/۱	۴۹/۵±۲۸/۵	۹/۳۳	*۰/۰۰۱
	۰/۰۱	۲۵/۶±۹/۶		
	۰/۰۰۱	۱۲/۴±۱/۲		
۴ ساعت	۰/۱	۶۳/۲±۲۶/۲	۱۴/۸۹	*۰/۰۰۰۱
	۰/۰۱	۳۷/۷±۱۲/۹		
	۰/۰۰۱	۱۷±۳/۵		
۶ ساعت	۰/۱	۸۲/۲±۲۰/۴	۲۴/۶	*۰/۰۰۰۱
	۰/۰۱	۵۳/۳±۱۹/۲		
	۰/۰۰۱	۲۲/۹±۸/۴		

*: سطح معناداری کمتر از ۰/۰۰۵ در نظر گرفته شده است).

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱: تأثیر کلی کشندگی عصاره‌های مختلف و نرمال سالین در زمان‌های مختلف

با توجه به جدول۱ متوسط میزان کشندگی غلظت ۰/۱ درصد در همه زمان‌ها بالاتر از بقیه غلظت‌ها و به تعداد ۸۲/۲ می‌باشد. متوسط میزان کشندگی در غلظت ۰/۰۱٪ در ۶ ساعت پس از مواجهه تعداد ۵۳/۳ می‌باشد که بیشترین کشندگی در این غلظت می‌باشد.در مورد غلظت ۰/۰۰۱٪ نیز بیشترین میزان کشندگی پس از گذشت ۶ ساعت و به تعداد ۲۲/۹٪ دیده شد.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که در غلظت ۰/۱٪ عصاره در همه زمان‌های مطالعه بیشترین تعداد پروتواسکولکس‌ها از بین رفته‌اند. علاوه بر این مطالعه نشان داد که میزان کشندگی با افزایش مدت زمان تماس، افزایش و نیز با کاهش غلظت عصاره، کاهش می‌یابد.

طبق جدول ۱ (نوع آزمون آماری: Anova)، در میانگین تعداد پروتواسکولکس‌های کشته شده در اثر غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های تعیین شده بعد از مواجهه، تفاوت آماری معناداری دیده شد به این صورت که تعداد پروتواسکولکس‌های کشته شده در غلظت ۰/۱ به‌صورت معناداری بیشتر از غلظتهای ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ در تمامی زمان های بعد از مواجهه بود و بر اساس آزمون Anova این اختلاف به لحاظ آماری معنادار بود.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر کشندگی غلظت‌های مختلفی از عصاره ریشه گیاه انار *(Punica granatum L.)* بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک در شرایط آزمایشگاهی (Invitro) بوده است.

در مطالعه ما، ۵۰ کبد گوسفندی آلوده به کیست هیداتید مورد ارزیابی قرار گرفتند که در بررسی یافته‌ها به نتایجی به شرح زیر دست یافتیم:

اثرات ضد پروتو اسکولکسی عصاره ریشه انار در غلظت‌های مختلف و مدت زمان‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. بیشترین میزان اثر اسکلوسیدال مربوط به غلظت ۰/۱٪ در تمامی زمانها می‌باشد که به زمان‌های مداخله وابسته است و بیشترین تعداد پروتواسکولکس‌ها را از بین می‌برد. عصاره ریشه انار می‌تواند تمام پروتواسکولکس‌ها را از بین ببرد و این فعالیت اسکولوسیدال در

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت ۰/۱٪ در زمان ۶ ساعت پس از مواجهه اتفاق می‌افتد (با میانگین تعداد ۸۲/۲ کشته شده). با این وجود غلظتهای۰/۰۱٪ و ۰/۰۰۱ عصاره در همان مدت منجر به تأثیرات اسکولوسیدال کافی نگردیده است و کمترین میزان کشندگی به غلظت ۰/۰۰۱٪ عصاره در دقیقه ۳۰ ام با میانگین تعداد ۶ پروتواسکولکس کشته شده، مربوط می‌شد.

در مطالعات دیگری که تأثیر عصاره‌های گیاهی روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید آزمون شده است، در مقایسه با تحقیق زیبایی و همکاران[۱۲] غلظت ۰/۱٪ عصاره‌های آبی گیاه مرزه خوزستانی و اسانس برگ زیتون همانند تحقیق ما، بیشترین اثر ضد پروتواسکولکسی را به خود اختصاص داده بودند ولی در مورد اسانس برگ زیتون، در ۱۲۰ دقیقه، غلظت‌های ۰/۱٪ و ۰/۰۱٪ اثرات کشنده پروتواسکولکسی قوی داشتند که به ترتیب میانگین پروتواسکولکس‌های کشته شده عبارتند از۱۰۰/۰و ۹۹/۵ و کمترین میزان کشندگی، در غلظت ۰/۰۰۱ و در ۳۰ دقیقه پس از مواجهه و به میزان ۴۸/۳ رخ داده بود. در مورد مرزه خوزستانی، در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه غلظت ۰/۱٪ عصاره، اثرات کشنده پروتواسکولکسی خیلی قوی داشت که در هر سه زمان پس از مواجهه تمام پروتواسکولکس‌ها کشته شدند (۱۰۰/۰). در مورد بیشترین تعداد کشته شده‌ها در اثر غلظت ۰/۰۱ عصاره، بیشترین مقدار ۸۸/۹ در ۳۰ دقیقه و ۸۵/۵ در ۶۰ دقیقه و ۷۱/۶ در ۱۲۰ دقیقه پس از مواجهه و در رابطه با تأثیر غلظت ۰/۰۰۱ عصاره، ۷۹/۴ در ۳۰ دقیقه و ۷۹/۲ در ۶۰ دقیقه و ۶۹/۸ در ۱۲۰ دقیقه پس از مواجهه مشاهده گردید. همچنین کمترین میزان تأثیر مربوط به غلظت ۰/۰۰۱ و به میزان ۶۹/۱ و ۳۰ دقیقه پس از مواجهه بوده است. در هر دو تحقیق ذکر شده در مقایسه با تحقیق ما زمان اثر کوتاه‌تر بوده است. در تحقیق ما فقط پس از ۶ ساعت از مواجهه تمام پروتواسکولکس‌ها کشته می‌شدند با میانگین ۸۲/۲ بررسی‌ها نشان دادند که سرعت مرگ و میر، با غلظت‌های پایین‌تر کاهش و با پیشرفت زمان، افزایش یافت. مرور این سه مطالعه نشان داد که اثرات کشنده اسکولکسی مرزه خوزستانی علیه پروتواسکولکس‌های اکینوکوکوس کیست هیداتید مؤثرتر از عصاره برگ زیتون است و تأثیر برگ زیتون نیز بیش از انار است.

شاید بتوان تاثیرات کمتر انار بر روی پروتواسکولکس‌ها را به نوع انار و درصد مواد مؤثره ی آن دخیل دانست. طبق اطلاعات موجود، در ایران بیش از ۷۰۰ نوع انار موجود است و این تفاوت‌های ژنتیکی به احتمال بسیار قوی موجب تفاوت در خواص این میوه نیز خواهد شد. طبق مطالعه مازندرانی و همکاران، در رویشگاه های مختلف مثل نواحی کوهستانی و جنگلی یا زیستگاه‌های شنی دریای خزر در یک منطقه آب و هوایی مانند استان گلستان، میزان مواد فعال ثانوی و دارویی در اندام‌های مختلف گیاه انار متفاوت است.

بر این اساس میتوان هر کدام از این عوامل را در تأثیرات مشاهده شده در این تحقیق دخیل دانست.

می‌توان از رقم‌های متفاوت انار که در جایگاه های مختلف رشد یافته‌اند برای مطالعات بیشتر استفاده نمود و درستی یا نادرستی نظرات گفته شده را آزمون کرد.

Archive of SID

References

1. Aktan AO, Yalin R. Preoperative albendazole treatment for liver hydatid disease decreases the viability of the cyst. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996;8: 877-879.
2. Azadbakht M. Herbal medicines against 5 common protozoa. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 1387;18(67): 118-132.[In Persian]
3. Dell'Agli M, et al. *Antiplasmodial activity of Punica granatum L. fruit rind*: Journal of Ethnopharmacology 2009;125 :279–285.
4. Fattahi Bafti A, Anvari MH. Geographical pathology of hydatid disease in Iran, Hamedan. Congress of hydatid disease (Brief article). 1372: 59-60.[In Persian]
5. Kammerer WS, Schantz PM. Echinococcal disease. Infect Dis Clin North Am. 1993;7(3):605-18.
6. Mohseni A, *Punica granatum/* Production Guide, Akhar publication, Tehran, 1389.[In Persian]
7. Nourjah N. Hydatidosis-Echinococcosis and appointing the economic losses to pertain. PHD Thesis in Medical parasitology. Tehran: faculty (or college) of hygiene 1995; 43-58.

www.SID.ir

8. Pesian J, Azarmi N. Hydatid Disease and Its 7 years cases in Tehran Firouzgar Hospital. Hamedan, Congress of hydatid disease (Brief article) 1993:22-23.

9. Rokni MB. Echinococcusis/ hydatidose in Iran. Iranian J Parasitol. 2009; 4: 1-16

10. Samsam Shariat H. Extraction and mining of active ingredients from medical plants. Mani Press, 1386.[In Persian]

11. Zargari A. medical plants. 4th ed. Tehran university publication.Tehran 1990: 42-45.[In Persian]

12. Zibaei M, Sarlak AA, Delfan B, Ezatpour B, Azargoun AR. In-vitro scolicidal effects of *Olea europaea* and *Satureja Khozestanica* extracts on protoscloces of hydatid cysts. Korean J Parasitol 2012; 50(1): 53-56.

Archive of SID

www.SID.ir