

Original Paper

Comparison of the *in vitro* effect of *Cannabis sativa* Essential Oil with Albendazole on Protoscolices of Hydatid Cyst

Amir Reza Youssefi (DVM), Academic Instructor, Department of Veterinary Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1099-2379

***Mohammad Reza Youssefi (Ph.D)**, Corresponding Author, Associate Professor, Department of Veterinary Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. E-mail: youssefi929@hotmail.com ORCID ID: 0000-0002-8606-2266

Mohaddeseh Abouhosseini Tabari (Ph.D), Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5930-4979

Abstract

Background and Objective: Echinococcosis *granulosus* is a major zoonotic disease, and surgery is the best treatment for it. So far, several chemical scolicidal agents have been used to prevent protoscolices leakage during surgery, but due to their adverse effects were not well-received. Therefore, using medicinal plants or compounds derived from them as alternatives were taken into consideration. This study was conducted to compare the *in vitro* effect of *Cannabis sativa* essential oil with albendazole on protoscolices of hydatid cyst.

Methods: In this descriptive-analytic study, essential oil of *C. sativa* was prepared from aerial parts of the plant in flowering season in university of Camerino, Italy, and Gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed. Protoscolices were extracted from the livers infected with hydatid cyst and were exposed to different concentrations of *C. sativa* (1, 2, 5 and 10 µg/ml) for 10, 30, 60 and 120 minutes. The viability of protoscolices was measured by 0.1% eosin staining. Albendazole was used as a standard medicinal drug.

Results: Essential oil of *C. sativa* at all tested concentrations led to significant mortality in protoscolices which showed a direct relation with increase in concentration ($P < 0.05$). The highest concentration of albendazole after 2 h led to 13.24% mortality rate while, this amount with *C. sativa* essential oil at 2µg/ml reached to 20.9%, and at 10µg/ml reached to 26.08%.

Conclusion: This study showed that *C. sativa* essential oil has promising scolicidal effect compared to albendazole and can be suggested as a natural protoscolicidal agent.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, Green drug, Essential oil, Albendazole

Received 30 Dec 2018

Revised 19 May 2019

Accepted 22 May 2019

مقایسه اثر برون تنی اسانس شاهدانه (*Cannabis sativa*) با آلبندازول

بر پروتواسکولکس های کیست هیداتید

ORCID ID: 0000-0002-1099-2379

امیررضا یوسفی، مربی گروه انگل شناسی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-8606-2266

* دکتر محمدرضا یوسفی، دانشیار گروه انگل شناسی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-5930-4979

دکتر محدثه ابو حسینی طبری، استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اکتینوکوکوزیس گرانولوزوس از بیماری های مهم مشترک انسان و دام است و جراحی بهترین روش درمان آن است. تاکنون اسکولکس کش های شیمیایی متعددی برای جلوگیری از نشت پروتواسکولکس ها حین عمل جراحی استفاده شده اند؛ اما با توجه به عوارض جانبی خیلی مورد استقبال قرار نگرفته اند. از این رو استفاده از گیاهان دارویی یا ترکیبات مشتق شده از آنها به عنوان ترکیبات جایگزین مورد توجه قرار گرفته اند. این مطالعه به منظور مقایسه اثر برون تنی اسانس شاهدانه (*Cannabis sativa*) با آلبندازول بر پروتواسکولکس های کیست هیداتید انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی اسانس شاهدانه از قسمت های هوایی گیاه در فصل گلدهی در دانشگاه کامرینو ایتالیا تهیه و آنالیز کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی انجام شد. پروتواسکولکس ها از کبدهای آلوده به کیست هیداتید استخراج و به مدت ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در معرض غلظت های مختلف (۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر) اسانس شاهدانه قرار گرفتند. میزان زنده بودن پروتواسکولکس ها به وسیله رنگ آمیزی اتوزین ۰/۱ درصد سنجیده شد. از آلبندازول به عنوان داروی استاندارد استفاده گردید.

یافته ها: اسانس شاهدانه در تمامی غلظت های مورد استفاده موجب از بین رفتن معنی دار در پروتواسکولکس ها گردید که با افزایش غلظت رابطه مستقیم نشان داد ($P < 0/05$). بالاترین غلظت از آلبندازول پس از ۲ ساعت ۱۳/۲۴ درصد از بین رفتن را موجب شد. در حالیکه این میزان در تیمار با شاهدانه ۲۰/۹ درصد و در غلظت ۱۰۰ μg/ml به ۲۶/۰۸ درصد رسید.

نتیجه گیری: اسانس شاهدانه دارای اثر پروتواسکولکس کشی قابل قبولی در مقایسه با داروی آلبندازول است و می توان آن را به عنوان یک ماده پروتواسکولکس کش طبیعی پیشنهاد نمود.

کلید واژه ها: اکتینوکوکوس گرانولوزوس، داروی سبز، شاهدانه، اسانس، آلبندازول

* نویسنده مسؤول: دکتر محمدرضا یوسفی، پست الکترونیکی youssefi929@hotmail.com

نشانی: بابل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، دانشکده دامپزشکی، گروه انگل شناسی، تلفن ۰۱۱-۳۲۴۱۵۱۵۹-۳۲۴۱۵۰۹۰، نمابر

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۱۹، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۲/۲۹، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۳/۱

مقدمه

اکتینوکوکوزیس گرانولوزوس (*Echinococcus granulosus*) یا عفونت کیست هیداتید، از بیماری های مهم مشترک انسان و دام است که انتشار جهانی دارد و توسط فرم لاروی کرم های نواری جنس اکتینوکوکوس ایجاد می شود (۱). این بیماری در مناطق روستایی که در آن ارتباط نزدیک تری بین سگ، دام و انسان وجود دارد؛ شایع تر است. این بیماری، علاوه بر آسیب های جدی بر سلامت انسان و مرگ احتمالی، با ایجاد هزینه های درمانی و همچنین کاهش فرآورده های دامی، به عنوان یک چالش عمده بهداشت عمومی و اقتصادی در نظر گرفته می شود (۲).

هیداتیدوزیس یک بیماری زئونوز بوده که دارای انتشار جهانی است. ایران از مناطق اندمیک این بیماری است. طی مطالعه ای که

عندلیب علی آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر میزان شیوع این بیماری انجام دادند؛ مشخص گردید در ایران سالانه به طور متوسط ۱۳۴/۲ مورد جراحی کیست هیداتیک انجام می شود (۳). از آنجا که تنها راه درمان این بیماری جراحی است و جراحی نیز همیشه از خطر بالایی برخوردار است؛ لذا استفاده از ترکیبات اسکولکس کش مناسب و بی خطر برای محدود کردن این بیماری می تواند کاربرد مناسبی پیدا کند. در درمان جراحی کیست، در صورت در نظر نگرفتن تمهیدات لازم، خطر نشت پروتواسکولکس ها و کاشته شدن آن در احشاء و بافت ها در حین عمل وجود خواهد داشت که این مسأله از دلایل اصلی بازگشت بیماری و تشکیل کیست های ثانویه است. برای اجتناب از نشت محتویات کیست، استفاده از اسکولیسیدال موثر برای جلوگیری از بازگشت بیماری ضروری

شناسایی اجزای شیمیایی اسانس در دانشکده داروسازی دانشگاه کامرینو انجام و نتیجه آن به دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد بابل ارسال شد.

تهیه پروتواسکولکس کیست هیداتید: کبدهای آلوده به کیست هیداتید گوسفند از کشتارگاه شهرستان آمل تهیه و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل منتقل شدند. سطح این کبدها توسط پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد شستشو و ضد عفونی شدند. بعد از ضد عفونی، محتویات کیست‌ها از جمله پروتواسکولکس‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس و مایعات به داخل ارلن استریل تخلیه شدند. بعد از تخلیه کامل کیست‌ها و پرشدن ارلن به مدت چند دقیقه صبر کرده تا پروتواسکولکس‌ها ته‌نشین شدند. پس از ته‌نشین شدن کامل پروتواسکولکس‌ها، مایع رویی تخلیه و پروتواسکولکس‌های ته‌نشین شده درون ارلن، سه مرتبه با سرم نرمال سالین شستشو داده شدند. به‌طور میانگین برای هر مرحله شست و شو ۲۰ دقیقه زمان صرف ته‌نشین شدن و خارج کردن با دقت مایعات و نگه داشتن پروتواسکولکس‌ها شد.

تست زنده بودن پروتواسکولکس‌ها (Viability test): برای تعیین درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها، به وسیله سمپلر، ۲۰ لانداز مایع آماده شده محتوی پروتواسکولکس را روی لام ریخته و به همان حجم (۲۰ لانداز) محلول رنگ اتوزین ۰/۱ درصد در کنار نمونه قرار داده شد. سپس با یک لامل و به آرامی به وسیله گوشه آن رنگ و پروتواسکولکس‌ها را مخلوط کرده و بعد لامل به آرامی روی محلول آماده شده حاوی رنگ قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه پروتواسکولکس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین صورت که پروتواسکولکس‌های زنده یعنی آنهایی که رنگ نگرفتند؛ مورد شمارش قرار گرفتند. حداقل ۵ شان میکروسکوپی پروتواسکولکس برای تست زنده بودن مورد شمارش قرار گرفت. میزان زنده بودن پروتواسکولکس‌ها حدود ۹۵ درصد تعیین شد (۱۴) (شکل یک).

ارزیابی فعالیت اسکولکس کشی در شرایط آزمایشگاهی: اثر اسکولکس کشی چهار غلظت ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس گیاه شاهدانه در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در مقایسه با دو غلظت ۱ و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلبندازول مورد ارزیابی قرار گرفت. از حلال DMSO (دی متیل سولفو کساید) با غلظت یک درصد (۰/۱ میلی لیتر DMSO در ۹/۹ میلی لیتر نرمال سالین) استفاده شد. برای آماده سازی اسانس شاهدانه، ۱۰ لانداز از اسانس در یک میلی لیتر DMSO یک درصد به خوبی حل شد. به منظور آماده سازی آلبندازول، ۰/۰۱ گرم از پودر استاندارد آلبندازول در یک میلی لیتر DMSO یک درصد حل شد. برای رنگ آمیزی از اتوزین ۰/۱ درصد (۰/۱ گرم پودر اتوزین در ۱۰۰ میلی لیتر نرمال

است) (۴). تاکنون اسکولکس‌کش‌های شیمیایی زیادی چون فرمالین ۲ درصد، سرم نمکی - هایپرتونیک ۲۰ تا ۳۰ درصد، محلول ستریماید - اسکولیساید، نیترات نقره و بتادین به کار گرفته شده‌اند. استفاده از این ترکیبات در برخی از موارد به بروز عوارض جانبی شدیدی از جمله فیروز مجاری صفراوی، نکروز کبد و بافت‌های سالم مجاور کیست می‌انجامد (۵). بنزیمیدازول‌ها برای درمان کیست هیداتید انسانی با گزارشات متفاوت از میزان موفقیتشان مورد استفاده قرار می‌گیرند. مبنادازول از اولین این ترکیبات بود؛ ولی به علت جذب اندک، مقادیر سرمی و داخل کیستی آن پایین بود و مقدار کافی دارو به داخل کیست‌ها نفوذ نمی‌کند. آلبندازول داروی جدیدتری است که در درمان کیست هیداتید کارایی بهتری را در مقایسه با مبنادازول نشان داده است (۶).

مطالعات محدودی در مورد پتانسیل استفاده از اسانس علیه پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید انجام شده‌اند. گیاه شاهدانه با نام علمی *Cannabis sativa* و با نام انگلیسی Indian hemp گیاهی علفی یک‌ساله و به ارتفاع ۱ تا ۴ متر است. خاستگاه این گیاه آسیای مرکزی است. شاهدانه گیاهی بوته‌ای و گلدار از خانواده کانابیناسه است که برگ‌های مرکب پنجه‌ای با برگچه‌های دندانه‌ای دارد (۷). گل‌های ماده و برگ‌های اطراف گل، رزین و دانه‌های این گیاه استفاده دارویی دارند. از شاهدانه به صورت سنتی در درمان روماتیسم و آسم، بیماری‌های التهابی مانند بیماری‌های پوستی و بیماری‌های قلبی - عروقی استفاده می‌شود. این گیاه دارای خواص آرامبخش، مسکن، خواب آور و دارای ترکیبات ضد تشنجی است (۸). با توجه به این که اثرات ضد انگلی برخی از اسانس‌های گیاهی بر روی انگل‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته و تا حدودی به اثبات رسیده (۹-۱۳) و با توجه به خواص زیاد گیاه شاهدانه، این گیاه گزینه مناسبی برای بررسی خاصیت اسکولکس کشی به‌نظر می‌رسد. متابولیت‌های ثانویه ترپنوئیدی به‌عنوان تشکیل‌دهنده بیشترین درصد اجزای شیمیایی اسانس گزارش شده‌اند. کاریوفیلن (Caryophyllene)، آلفا-پینن (pinene-) و میرسن (Myrcene) بیشترین درصد را در اجزای شیمیایی اسانس هستند (۱۳).

این مطالعه به منظور مقایسه اثر اسانس شاهدانه با آلبندازول بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل طی سال ۱۳۹۷ انجام شد.

تهیه اسانس: اسانس گیاه شاهدانه از قسمت‌های هوایی گیاه در فصل گلدهی در دانشگاه کامرینو (Camerino) ایتالیا تهیه شد. کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC - MS) برای

آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و تست تعقیبی Bonferroni برای بررسی اختلاف میان گروه‌های مختلف استفاده شد. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

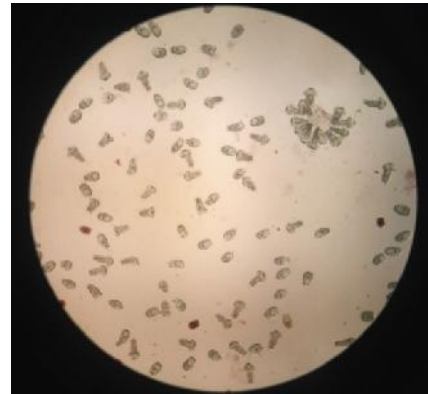
یافته‌ها

نتایج حاصل از میزان از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها در تیمارهای مختلف در جدول یک آمده است.

در تیمار با اسانس شاهدانه با غلظت ۱ μg/ml میزان از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها در بازه‌های زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه اختلاف آماری معنی داری نشان نداد. در حالی که اختلاف میانگین از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها در همین غلظت میان زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه از نظر آماری معنی دار بود (P<۰/۰۱۹). در غلظت ۲ μg/ml از اسانس شاهدانه میان از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه (P<۰/۰۰۶)، ۶۰ دقیقه و ۱۲۰ دقیقه (P<۰/۰۰۲) اختلاف آماری معنی داری نشان داد. در غلظت ۵ μg/ml اختلاف میان میزان از بین رفتن در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه (P<۰/۰۰۶)، ۳۰ و ۶۰ دقیقه (P<۰/۰۰۱) و ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه (P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنی دار بودند. در غلظت ۱۰ μg/ml اختلاف میان میانگین از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه (P<۰/۰۰۷)، ۳۰ و ۶۰ دقیقه (P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنی دار بودند.

بیشترین میزان از بین رفتن در زمان ۱۰ دقیقه در گروه شاهدانه با غلظت ۱۰ μg/ml (۱۷/۴۶±۰/۱۴) درصد) مشاهده شد که در مقایسه با تمامی گروه‌ها معنی دار بود (P<۰/۰۰۱). با افزایش میزان غلظت اسانس شاهدانه میزان مرگ و میر نیز به طور معنی داری افزایش نشان داد که بیانگر رابطه معنی دار میان غلظت تیمار و اثر کشندگی حاصل از آن است. در زمان ۳۰ دقیقه بیشترین میزان از بین رفتن در گروه شاهدانه ۱۰ μg/ml (۲۰/۲±۰/۱۸) درصد) و کمترین میزان در تیمار حاصل از آلبندازول با غلظت ۱ μg/ml (۹/۱۶±۰/۸۶) درصد) مشاهده شد. تمامی تیمارها در زمان ۳۰ دقیقه منجر به اثر اسکولکس کشی معنی دار در مقایسه با گروه کنترل شدند (P<۰/۰۰۱). در بررسی میزان از بین رفتن پس از گذشت ۶۰ دقیقه، تمامی گروه‌ها منجر به بروز اثر معنی دار در مقایسه با گروه

سالین) استفاده شد. به هر کدام از چاهک‌های میکروپلیت یک میلی لیتر از محلول پروتواسکولکس کیست هیداتید حاوی تقریباً ۱۰۰۰ پروتواسکولکس با کمک سمپلر اضافه شد و به ترتیب غلظت‌های مورد نظر از اسانس شاهدانه و آلبندازول به چاهک‌ها اضافه گردید.



شکل ۱: تست زنده بودن پروتواسکولکس‌ها

گروه شاهد هیچ تیماری را به جز DMSO یک درصد دریافت نمود. سپس تمامی چاهک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه به کمک سمپلر پس از همگن کردن هر چاهک به طور مجزا، ۲۰ لانداز از محلول برداشته و روی لام قرار داده و با هم حجم آن (۲۰ لانداز) رنگ انوزین ۰/۱ درصد به کمک لبه لامل ۲۴ در ۲۴ میلی متری مخلوط و روی آن لامل قرار گرفت و پس از ۱۰ دقیقه به کمک میکروسکوپ نوری نسبت پروتواسکولکس‌های مرده به زنده در ۵ شان میکروسکوپی لامل مورد شمارش قرار گرفت. اثر اسکولکس کشی این اسانس با داروی آلبندازول در دوزهای مشابه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (۳). این آزمایش ۳ مرتبه تکرار شد و در هر تکرار ترکیبات مجدداً آماده‌سازی و وسایل مورد استفاده استریل شدند.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. ابتدا بررسی توزیع نرمال داده‌ها به وسیله آزمون شاپیرو - ویلک انجام شد. در مرحله بعد از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های مکرر (Repeated measure) برای بررسی وجود اختلاف معنی دار در زمان‌های مختلف استفاده شد. از آزمون

جدول ۱: مقایسه اثر اسکولکس کشی اسانس شاهدانه و آلبندازول علیه پروتواسکولکس‌های اکینووکوکوس گرانولوزوس در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف در مقایسه با کنترل

زمان (دقیقه)	اسانس شاهدانه					
	۲ μg/ml	۱ μg/ml	۱۰ μg/ml	۵ μg/ml	۲ μg/ml	۱ μg/ml
۱۰	۱۳/۲۴±۰/۱۹aD	۱۵/۳۳±۰/۰۹aE	۱۵/۹۸±۰/۰۲aE	۱۷/۴۶±۰/۱۴aF	۶/۷۱±۰/۰۸aB	۸/۴۷±۰/۰۲aC
۳۰	۱۳/۸۹±۰/۰۹aC	۱۶/۰۷±۰/۱۲aD	۱۸/۸۷±۰/۱۵bE	۲۰/۲±۰/۱۸bF	۹/۱۶±۰/۰۸bB	۱±۰/۱bB
۶۰	۱۵/۴۲±۰/۱۷bC	۱۷/۶±۰/۱۷bD	۲۰/۴۷±۰/۱۲cE	۲۳/۲۲±۰/۱۷cF	۱۰/۸۷±۰/۱۴cB	۱۱/۶۹±۰/۱۷cB
۱۲۰	۱۷/۷۶±۰/۲۱cD	۲۰/۹±۰/۱۷cE	۲۳/۸۳±۰/۱۷dF	۲۶/۰۸±۰/۱۹dG	۱۱/۷±۰/۲۳dB	۱۳/۲۴±۰/۰۸dC

داده‌ها به صورت میانگین و خطای استاندارد بیان شده‌اند.

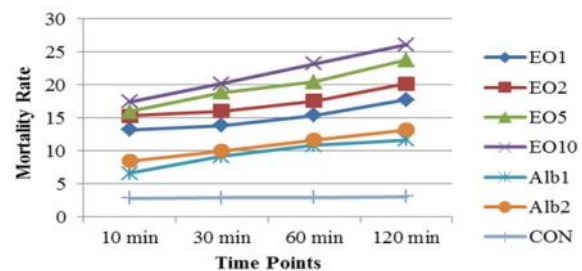
a, b, c, d میانگین‌ها با حروف غیرهمسان نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار در هر ستون است (P<۰/۰۰۵).

A, B, C, D, E, F, G میانگین‌ها با حروف غیرهمسان نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار در هر ردیف است (P<۰/۰۰۵).

در زمان ۵ دقیقه ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌ها کشته شدند (۱۷). محمودوند و همکاران در بررسی اثر عصاره پسته خوراکی برای غیرفعال کردن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید نشان دادند که با دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۱۰ دقیقه ۱۰۰ درصد اسکولکس‌ها از بین رفتند و اثرگذاری بسیار مناسبی مشاهده شد (۱۸). با توجه به استفاده از دوزهای پایین تر اسانس شاهدانه در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات قبلی به نظر می‌رسد غلظت‌های اسانس شاهدانه برای ایجاد از بین رفتن ۱۰۰ درصد در گروه‌های تیمار کافی نبودند و احتمالاً دوزهای بالاتر می‌توانند مقادیر از بین رفتن بیشتری را در پروتواسکولکس‌ها موجب شوند.

در مطالعه حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۶ اسانس درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*) بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید نشان داد که میزان اسکولکس‌کشی این اسانس در غلظت‌های ۵۱/۸، ۲/۵، ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه به ترتیب ۷۱/۵ درصد، ۸۲/۸ درصد و ۹۹/۳ درصد تعیین شد. آلبندازول با دوز مشابه در بازه‌های زمانی مشابه اثر کشندگی کمتری از خود نشان داد (۱۹). در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد اسانس درمنه دشتی از خاصیت اسکولکس‌کشی قوی‌تری در مقایسه با اسانس شاهدانه برخوردار است. زیرا در غلظت‌های پایین تر از بین رفتن بیشتری را موجب شده است. مطالعه رستمی و همکاران نشان داد که عصاره متانلی زنجبیل اثر بسیار خوبی بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید دارد؛ ولی عصاره متانلی درمنه گونه (*Artemisia aucheri*) اثر اسکولیسیدالی مناسبی بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید نداشت (۲۰). سجادی و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات عصاره‌های مختلف سیر (*Allium sativum*) را بر روی اسکولکس‌های کیست هیداتید مورد مطالعه قرار دادند. عصاره کلروفومی در غلظت ۲۰۰ mg/ml بیشترین تاثیر اسکولکس‌کشی را پس از ۱۲۰ دقیقه نشان داد و اثر اسکولیسیدال عصاره سیر وابسته به غلظت و زمان بود (۲۱). همسو با این مطالعه، در نتایج مطالعه حاضر نیز افزایش اثر اسکولکس‌کشی با بیشتر شدن زمان و غلظت اسانس شاهدانه قابل مشاهده است. مطالعه بر روی اثر اسکولیسیدال خانواده نعنائیان نشان داده است که اسانس پونه (*Mentha pulegium*) دارای اثر قوی‌تری نسبت به اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) است و میزان زنده ماندن اسکولکس‌ها در غلظت ۱۰ μg/ml اسانس پونه پس از دوره انکوباسیون ۱۲ روزه به کمتر از ۱۰ درصد رسید (۲۲). مطالعه طبری و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد که اسانس‌های شمعدانی عطری و باریجه در غلظت ۵۰ μg/ml پس از ۶۰ دقیقه منجر به از بین رفتن ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید شده است و مقادیر غلظت‌های کشته ۵۰ به ترتیب برابر با ۸/۵۲ و ۱۷/۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر

کنترل شدند ($P < 0/001$). اختلاف میان گروه‌های مختلف نیز معنی‌دار بود ($P < 0/05$). تیمار با شاهدانه ۱۰ μg/ml موجب (۱۷/۲۳±۰/۱۷) درصد از بین رفتن در جمعیت پروتواسکولکس‌های تحت تیمار گردید که در مقایسه با سایر تیمارها و همچنین هر دو غلظت مورد استفاده آلبندازول معنی‌دار بود ($P < 0/01$). در آخرین بازه زمانی مورد مطالعه (۱۲۰ دقیقه) اختلاف میانگین از بین رفتن میان تمام گروه‌های تحت تیمار با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/01$). اسانس شاهدانه در تمامی غلظت‌های مورد استفاده موجب از بین رفتن معنی‌دار در پروتواسکولکس‌ها گردید که با افزایش غلظت آن رابطه مستقیم نشان داد (نمودار یک). بالاترین غلظت از آلبندازول پس از ۲ ساعت $13/24 \pm 0/08$ درصد از بین رفتن را موجب شد. در حالی که این میزان در تیمار با شاهدانه ۲ μg/ml به $20/9 \pm 0/16$ درصد و در غلظت ۱۰ μg/ml به $26/08 \pm 0/19$ درصد رسید.



نمودار ۱: سمیت اسانس شاهدانه و آلبندازول در بازه‌های زمانی ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید EO10 اسانس شاهدانه با غلظت ۱۰ μg/ml، EO5 اسانس شاهدانه با غلظت ۵ μg/ml، EO2 اسانس شاهدانه با غلظت ۲ μg/ml، EO1 اسانس شاهدانه با غلظت ۱ μg/ml، Alb1 آلبندازول با غلظت ۱ μg/ml، Alb2 آلبندازول با غلظت ۲ μg/ml، CON کنترل

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اسانس شاهدانه در مقایسه با داروی استاندارد آلبندازول دارای اثر اسکولکس‌کشی قابل قبولی بود. نتایج مطالعه Elissondo و همکاران برای ارزیابی اثر پروتواسکولکس‌کشی تیمول بر روی کیست هیداتید مثبت بود و تیمول بر روی پروتواسکولکس‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس اثر کشندگی داشت؛ ولی این کشندگی در مدت زمان طولانی‌تری نسبت به معمول انجام گرفت (۱۵). Celina و María در بررسی اثر همزمان آلبندازول و تیمول علیه پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید اثرگذاری مثبت درمانی و اثر سینرژیستی این ترکیب دارویی را نشان دادند (۱۶). نتایج مطالعه محمودوند و همکاران در بررسی اثر عصاره گیاه زیره سیاه بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در حین عمل جراحی نشان داد که با دوز ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر

شاهدانه یا اجزای آن با داروی استاندارد آلبندازول ضروری به نظر می‌رسد. امید است با توجه به منشا طبیعی این تیمار، مطالعات بیشتر زمینه استفاده از این ماده را حین اعمال جراحی کیست هیداتید به تنهایی یا همراه با داروی استاندارد فراهم آورد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس شاهدانه می‌تواند به‌عنوان یک اسکولکس کش مناسب در نظر گرفته شود و پس از گذراندن تست‌های سمیت کبدی و سیستم صفراوی در صورت ایمن بودن به منظور از بین بردن و مهار پروتواسکولکس‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه (شماره ۱۷۶) آقای امیررضا یوسفی برای اخذ درجه دکتری عمومی در رشته دامپزشکی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل بود. نویسندگان هیچگونه تضاد منافی ندارند. شایسته است از آقایان دکتر میثم رامشگر رئیس محترم آزمایشگاه و دکتر امید خان محمدی مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقاتی ساها دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل به خاطر حمایت ایشان کمال تشکر و قدردانی به‌عمل آید.

References

1. Abunna F, Fentaye S, Megersa B, Regassa A. Prevalence of bovine hydatidosis in Kombolcha ELFORA abattoir, North Eastern Ethiopia. *Biomedical and Life Sciences*. 2012; 2(4): 281-86. doi: 10.4236/ojas.2012.24038
2. Dakkak A. Echinococcosis/hydatidosis: a severe threat in Mediterranean countries. *Vet Parasitol*. 2010 Nov; 174(1-2): 2-11. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.08.009
3. Andalib Aliabadi Z, Berenji F, Fata A, Jarahi L. Human Hydatidosis/Echinococcosis in North Eastern Iran from 2003-2012. *Iran J Parasitol*. 2015 Oct-Dec; 10(4): 658-62.
4. Topcu O, Sumer Z, Tuncer E, Aydin C, Koyuncu A. Efficacy of chlorhexidine gluconate during surgery for hydatid cyst. *World J Surg*. 2009 Jun; 33(6): 1274-80. doi: 10.1007/s00268-009-9971-z
5. Hazrati Tappe K, Mousavi SJ, Barazesh A. Prevalence and fertility of hydatid cyst in slaughtered livestock of Urmia city, Northwest Iran. *J Parasitol Vector Biol*. 2011; 3(2): 29-32.
6. Todorov T, Vutova K, Mechkov G, Georgiev P, Petkov D, Tonchev Z, Nedelkov G. Chemotherapy of human cystic echinococcosis: comparative efficacy of mebendazole and albendazole. *Ann Trop Med Parasitol*. 1992 Feb; 86(1): 59-66. doi: 10.1080/00034983.1992.11812631
7. Small E., Cronquist A. A practical and natural taxonomy for cannabis. *Taxon*. 1976; 25(4): 405-35. doi: 10.2307/1220524
8. Borhade SS., Chemical Composition and Characterization of Hemp(Cannabis sativa) seed oil and essential fatty acids by HPLC Method. *Arch Appl Sci Res*. 2013; 5(1): 5-8.
9. Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis and Hexamita inflata. *Parasitol Res*. 2006 Nov; 99(6): 722-28. doi: 10.1007/s00436-006-0234-8
10. Anthony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol*. 2005 Oct; 21(10): 462-68. doi: 10.1016/j.pt.2005.08.004

برای اسانس‌های شمعدانی عطری و باریجه گزارش شدند (۲۳). در مقایسه با مطالعه حاضر، بر اساس مقادیر غلظت‌های کشنده ۵۰ اسانس‌های شمعدانی عطری و باریجه اثر اسکولکس کش قوی‌تری نسبت به اسانس شاهدانه دارند. زیرا اسانس شاهدانه در بالاترین غلظت استفاده شده نیز منجر به ۲۶ درصد از بین رفتن در پروتواسکولکس‌ها شد.

کاروفیلین از اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس شاهدانه گزارش شده است (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که این ماده بخش اصلی تشکیل دهنده ترکیبات گیاهانی است که به‌طور سنتی برای درمان بیماری‌های انگلی استفاده می‌شوند (۲۴). محققین اثرات درمانی کاروفیلین علیه لیشمانیوز و تریپانوزوما را تایید نموده‌اند (۲۵ و ۲۶). احتمالاً کاروفیلین از طریق مهار فسفریلاسیون در میتوکندری اثرات سمی خود را اعمال می‌نماید. از آنجایی که بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده اسانس شاهدانه در مطالعه حاضر کاروفیلین است؛ این ترکیب می‌تواند از اجزای موثر در اثر اسکولکس کشی اسانس شاهدانه باشد.

مطالعات بیشتر برای بررسی اجزای اسکولکس کش اسانس شاهدانه، مکانیسم عمل آنها و احتمال فعالیت سینرژیستیک اسانس

11. Guarrera PM. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol*. 1999 Dec; 68(1-3): 183-92.
12. Esperandim VR, da Silva Ferreira D, Sousa Rezende KC, Magalhães LG, Medeiros Souza J, Pauletti PM, et al. In vitro antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of Piper cubeba. *Planta Med*. 2013 Nov; 79(17): 1653-55. doi: 10.1055/s-0033-1351022
13. Benelli G, Pavela R, Petrelli R, Cappellacci L, Santini G, Fiorini D, et al. The essential oil from industrial hemp (Cannabis sativa L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. *Industrial Crops and Products*. 2018; 122: 308-15. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.032
14. Moazeni M, Saharkhiz MJ, Hosseini AA. In vitro lethal effect of ajowan (Trachyspermum ammi L.) essential oil on hydatid cyst protoscolec. *Vet Parasitol*. 2012 Jun; 187(1-2): 203-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.025
15. Elissondo MC, Albani CM, Gende L, Eguaras M, Denegri G. Efficacy of thymol against Echinococcus granulosus protoscolec. *Parasitol Int*. 2008 Jun; 57(2): 185-90. doi: 10.1016/j.parint.2007.12.005
16. María AC, Celina EM. Efficacy of albendazole in combination with thymol against Echinococcus multilocularis protoscolec and metacestodes. *Acta Trop*. 2014 Dec; 140: 61-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.08.007
17. Mahmoudvand H, Tavakoli Oliaei R, Mirbadie SR, Kheirandish F, Tavakoli Kareskh A, Ezatpour B, et al. Efficacy and Safety of Bunium Persicum (Boiss) to Inactivate Protoscolec during Hydatid Cyst Operations. *Surg Infect (Larchmt)*. 2016 Dec; 17(6): 713-19. doi: 10.1089/sur.2016.010
18. Mahmoudvand H, Mirbadie SR, Ghasemi Kia M, Badparva E, Shamsadini Lori S, Fasihi Harandi M. Efficacy of Pistacia khinjuk Fruits on Viability of Hydatid Cyst Protoscolec and Its Acute Toxicity in Mice Model. *Iran J Parasitol*. 2016 Jul-Sep; 11(3): 383-

88.

19. Hosseini M, Yousefi M, Abouhosseini M. [Comparison of the Effect of Artemisia Sieberi Essential Oil and Albendazole Drug on Protoscolices of Hydatid Cyst under in Vitro Conditions]. J Babol Univ Med Sci. 2017; 19(12): 63-68. doi: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.63 [Article in Persian]

20. Rostami A, Taheri M, Gholizadeh M, Seyyedtabaei SJ, Raeghi S, Fallahi S. Scolicidal effect of some herbs on Echinococcus granulosus protoscoleces: a systematic literature review. Herb Med J. 2016; 1(1): 53-59.

21. Sadjjadi SM, Zoharizadeh MR, Panjeshahin MR. In vitro screening of different Allium sativum extracts on hydatid cysts protoscoleces. J Invest Surg. 2008 Nov-Dec; 21(6): 318-22. doi: 10.1080/08941930802348261

22. Maggiore MA, Albanese AA, Gende LB, Eguaras MJ, Denegri GM, Elisondo MC. Anthelmintic effect of Mentha spp. essential oils on Echinococcus granulosus protoscoleces and metacestodes. Parasitol Res. 2012 Mar; 110(3): 1103-12. doi: 10.1007/s00436-011-2595-x

23. Tabari MA, Youssefi MR, Nasiri M, Hamidi M, Kiani K, Alian

Samakkhah S, et al. Towards green drugs against cestodes: Effectiveness of Pelargonium roseum and Ferula gummosa essential oils and their main component on Echinococcus granulosus protoscoleces. Vet Parasitol. 2019 Feb; 266: 84-87. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.12.019

24. Monzote L, Stamberg W, Staniek K, Gille L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of Chenopodium ambrosioides on mitochondria. Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Nov; 240(3): 337-47. doi: 10.1016/j.taap.2009.08.001

25. Soares DC, Portella NA, Ramos MF, Siani AC, Saraiva EM. Trans-β-Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (Copaifera spp.). Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 761323. doi: 10.1155/2013/761323

26. Polanco-Hernández G, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Rosado ME, Guzmán-Marín E, Acosta-Viana KY, et al. Synergistic Effect of Lupenone and Caryophyllene Oxide against Trypanosoma cruzi. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 435398. doi: 10.1155/2013/435398