



Original Paper

Cytotoxic Effects of Purified Carbohydrates from the Hyaline Layer, Fluid, and Protoscolices of Hydatid Cysts on the Human Colorectal Cancer Cell Line (LS174T)

Zahra Jafari¹ , Mohamad Hossein Razi Jalali (Ph.D)²  , Sara Larki (Ph.D)^{*3}  , Mohamad Khosravi (Ph.D)⁴ 

¹ Ph.D Candidate in Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. ² Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. ³ Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. ⁴ Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Colorectal cancer is the third most common cancer in men and the second most common in women. The use of parasites or parasite antigens is one of the newest therapeutic approaches for cancer, although it has not yet been used or approved in human trials. This study aimed to determine the cytotoxic effects of purified carbohydrates from the hyaline layer, fluid, and protoscolices of hydatid cysts on the human colorectal cancer cell line (LS174T).

Methods: This descriptive-analytical study was conducted on two sheep and two cow livers infected with hydatid cysts, and the human colorectal adenocarcinoma cell line (LS174T) purchased from the Pasteur Institute of Iran at the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran during 2022. Cyst fluid, protoscolices, and the hyaline layer were isolated from the hydatid cyst-infected livers, and glycoproteins and glycolipids from different parts of the cyst were extracted using the chloroform-methanol method. Carbohydrates were purified using the beta-elimination method and their presence was confirmed using the phenol-sulfuric acid method. The cytotoxicity of purified carbohydrates on the LS174T cell line was evaluated using the methyl tetrazolium (MTT) assay for 24 hours.

Results: Concentrations of 0.5 and 0.25 of purified carbohydrates from glycoproteins and glycolipids of hydatid cysts significantly inhibited the growth of LS174T cells ($P < 0.05$). Initial cytotoxicity evaluation showed that purified carbohydrates from glycoproteins of sheep cyst fluid ($38.60 \pm 1.33\%$), glycoproteins of cow cyst hyaline layer ($36.61 \pm 1.76\%$), glycolipids of cow cyst hyaline layer ($38.94 \pm 2.99\%$), glycoproteins of cow cyst protoscolices ($40.27 \pm 3.66\%$), and glycolipids of sheep cyst protoscolices ($37.94 \pm 1.99\%$) had significantly more pronounced inhibitory effects ($P < 0.05$). Subsequent screening with the MTT assay revealed that purified carbohydrates from glycoproteins isolated from sheep hydatid cyst fluid ($52.35 \pm 10.24\%$), glycolipids isolated from cow hydatid cyst hyaline layer ($53.40 \pm 7.88\%$), and glycolipids isolated from sheep hydatid cyst protoscolices ($53.05 \pm 5.06\%$) had significantly more pronounced inhibitory effects on the growth of LS174T cancer cells ($P < 0.05$).

Conclusion: Carbohydrates isolated from glycoproteins and glycolipids of the hyaline layer, fluid, and protoscolices of hydatid cysts have significant anticancer effects on the LS174T colorectal cancer cell line.

Keywords: Colorectal Neoplasms, Hydatid Cyst, *Echinococcus granulosus*, Carbohydrates

*Corresponding Author: Sara Larki (Ph.D), E-mail: s.larki@scu.ac.ir



Received 19 Nov 2023

Final Revised 30 Jan 2024

Accepted 27 Feb 2024

Published Online 9 Sep 2024

Cite this article as: Jafari Z, Razi Jalali MH, Larki S, Khosravi M. [Cytotoxic Effects of Purified Carbohydrates from the Hyaline Layer, Fluid, and Protoscolices of Hydatid Cysts on the Human Colorectal Cancer Cell Line (LS174T)]. J Gorgan Univ Med Sci. 2024;26(3): 60-68. [Article in Persian]





Extended Abstract

Introduction

Colorectal cancer is the third most common cancer in men and the second most common in women. Currently, treatment options for colorectal cancer depend on various factors, such as tumor location, stage of disease, and overall patient health. Treatment may encompass surgery, the use of multiple drugs, such as fluoropyrimidines, irinotecan, oxaliplatin, and capecitabine, radiation therapy, chemotherapy, or a combination of them. On the one hand, patients with colorectal cancer face complications related to these treatment options. Hence, the need for more influential treatment methods is well felt.

The use of parasites or parasite antigens is one of the newest therapeutic approaches for cancer, although it has not yet been used or approved in human trials. In studies conducted on the carbohydrate antigens of hydatid cysts and the cross-reactivity of sera from breast cancer patients and healthy individuals with these antigenic fractions, carbohydrate antigens of hydatid cysts were found in all stages of the cyst and their frequency was higher in the hyaline layer. The simultaneous presence of hydatid cysts and hepatocellular carcinoma is rare, and *Echinococcus granulosus* seems to have protective effects against this cancer. Among the species of the Taeniidae family, which are common parasites worldwide, the genus *Echinococcus* is of great importance in terms of health and economy, particularly in human and animal communities. Hydatid cysts, usually caused by *Echinococcus granulosus*, consist of a single cavity with a thick wall. This unilocular cyst consists of two layers: Germinal layer and laminated layer. In fertile cysts, protoscolices are located on the inner or germinal membrane of the cyst. The hyaline layer has a dense and voluminous structure that is only observed in the genus *Echinococcus* and is highly enriched in carbohydrate compounds. Hydatid cyst antigens have anti-melanoma activities, and these effects are related to the immune system's response to parasitic antigens. The anti-tumor activity of hydatid cyst fluid against breast cancer has also been attributed to increased immune responses to parasitic antigens. Therefore, various methods can be used, including the isolation and synthesis of compounds and molecules of parasites such as *Toxoplasma gondii* and *Echinococcus granulosus* to identify and produce compounds that contribute to eliciting the immune system against cancers. Hence, this study aimed to determine the cytotoxic effects of purified carbohydrates from the hyaline layer, fluid, and protoscolices of hydatid cysts on the human colorectal cancer cell line (LS174T).

Methods

This descriptive-analytical study was conducted on two sheep and two cow livers infected with hydatid cysts and the human colorectal cancer cell line (LS174T).

Two sheep and two cow livers infected with unilocular fertile hydatid cysts caused by *Echinococcus granulosus* in the terminal stages of the disease and containing cyst fluid were collected from a slaughterhouse. The cyst surfaces were sterilized with 70% alcohol, and the cyst contents were collected using 20 cc syringes.

The collected cyst fluid was examined under a light microscope for the presence of protoscolices. After observing the presence of protoscolices, the cyst contents were centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes. The supernatant, as the hydatid cyst fluid, was carefully removed and stored in Falcon tubes. The resulting precipitate, which consisted of protoscolices separated from the cyst fluid, was stored in Falcon tubes until use. Subsequently, the contents of the Falcon tubes containing the cyst fluid were poured into sterile Petri dishes and concentrated and dried for 24 hours to obtain crude cyst fluid antigens, which were stored at -20°C for subsequent study stages. The precipitate of compressed protoscolices at the bottom of the Falcon tubes was sonicated using ultrasonic waves. Then, they were incubated at 37°C for 48 hours. After 48 hours, the liquid in the Petri dishes was dried, and the Petri dishes were removed under sterile conditions and transferred to a laminar flow hood. Then, the dried liquid in the Petri dishes was scraped with a sharp object and poured as a powder into small microtubes, and was sonicated using a Bandelin electronic (Germany) sonicator for 2 pulses of 15 seconds each. These sonicated protoscolices, as crude protoscolice antigens, were also stored at -20°C in the freezer for further studies. Moreover, a portion of the collected cyst wall was cut into smaller pieces, washed several times in a mixture of phosphate buffered saline (PBS), penicillin (300 IU), and

streptomycin (0.3 mg/ml), and frozen and thawed several times for 24 hours to help remove the germinal layer. The hyaline layer was then separated and, after homogenization, was sonicated for 5 pulses of 15 seconds and 10 pulses of 15 seconds for sheep and cow hyaline wall antigens, respectively, ultimately turning into slurry, which was stored as a crude hyaline cyst wall antigen at -20°C in the freezer for future studies.

A chloroform-methanol 20 extraction method was employed to isolate glycoproteins and glycolipids from the antigens isolated from the three components of the cysts: Hyaline layer, fluid, and crude protoscolices.

A β -elimination method at 37°C was employed to isolate carbohydrates from the glycoprotein and glycolipid components of the antigens extracted from different parts of the cyst.

Bovine and ovine glycolipid and glycoprotein antigen samples were transferred to activated dialysis bags.

A phenol-sulfuric acid method was employed to confirm the presence of carbohydrates in each of the antigen solutions isolated from the cyst.

The cytotoxicity of carbohydrates purified from antigens isolated from hydatid cysts on colorectal cancer cells was evaluated using the methyl tetrazolium (MTT) assay. The MTT assay was employed to assess the cytotoxicity of twelve bovine and ovine glycolipid and glycoprotein antigens on colorectal cancer cells.

In order to further investigate and screen the antigens, the cytotoxicity of carbohydrates purified from the five antigens with the highest cytotoxicity against the LS174T cell line was re-evaluated using the MTT assay.

Results

Carbohydrates purified from glycoproteins isolated from sheep hydatid cyst fluid, glycolipids isolated from sheep hydatid cyst protoscolices, glycolipids isolated from bovine hydatid cyst hyaline layer, glycoproteins isolated from bovine hydatid cyst hyaline layer, and glycoproteins isolated from bovine hydatid cyst protoscolices demonstrated the greatest inhibitory effects on the growth of LS174T cells. In order to further screen, the inhibitory effects of carbohydrates purified from these five antigens on the growth of LS174T cancer cells were re-evaluated using the MTT assay, and the carbohydrates purified from the five selected antigens significantly inhibited cell growth. Carbohydrates purified from glycoproteins extracted from sheep hydatid cyst fluid, glycolipids extracted from sheep hydatid cyst protoscolices, and glycolipids extracted from bovine hydatid cyst hyaline layer exhibited the greatest inhibitory effects on the growth of LS174T cancer cells ($P < 0.05$).

Conclusion

According to the results, carbohydrates purified from antigens isolated from the cyst significantly inhibited the growth of colorectal cancer cells. Carbohydrates purified from five antigens, including glycoproteins from sheep cyst fluid, glycoproteins from bovine cyst hyaline layer, glycolipids from bovine cyst hyaline layer, glycoproteins from bovine cyst protoscolices, and glycolipids from sheep cyst protoscolices, appeared to have the greatest inhibitory effects on cell growth. Treatment of cells with carbohydrates purified from glycoproteins extracted from sheep hydatid cyst fluid, glycolipids from sheep hydatid cyst protoscolices, and glycolipids from bovine hydatid cyst hyaline layer gave rise to the greatest inhibitory effects on cancer cell growth.

Ethical Statement

This study was approved by the Research Ethics Committees of Shahid Chamran University of Ahvaz (EE/1401.2.24.226665/scu.ac.ir).

Funding

This article has been extracted from the Ph.D. dissertation of Zahra Jafari in Parasitology from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz.

Conflicts of Interest

No conflict of interest.

Acknowledgment

The authors would like to thank the Research Vice-Chancellor of Shahid Chamran University of Ahvaz for the financial support.

Carbohydrates isolated from glycoproteins and glycolipids of hyaline layer and protoscolices of the hydatid cyst fluid exhibited significant anticancer effects on the LS174T colorectal cancer cell line.



تحقیقی

اثر سمیت سلولی کربوهیدرات‌های تخلیص شده از لایه هیالن، مایع و پروتواسکولکس کیست هیداتید بر رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی (LS174T)

زهرا جعفری^۱، دکتر محمدحسین راضی جلالی^۲، دکتر سارا لرکی^{۳*}، دکتر محمد خسروی^۴

^۱ دانشجوی دکتری انگل شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. ^۲ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. ^۳ استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. ^۴ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان است. استفاده از انگل‌ها یا آنتی‌ژن‌های انگل یکی از نوین‌ترین روش‌های درمانی برای سرطان است که هنوز در فاز انسانی مورد استفاده و تایید قرار نگرفته است. این مطالعه به منظور تعیین اثر سمیت سلولی کربوهیدرات‌های تخلیص شده از لایه هیالن، مایع و پروتواسکولکس کیست هیداتید بر رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی روی دو کبد گوسفند و دو کبد گاو آلوده به کیست هیداتید و رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی (LS174T) خریداری شده از انستیتو پاستور ایران در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز طی سال ۱۴۰۱ انجام شد. مایع کیست، پروتواسکولکس‌ها و نیز لایه هیالن از کبد‌های آلوده به کیست هیداتید جدا شدند و گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای بخش‌های مختلف کیست به روش کلروفرم - متانول استخراج شدند. با روش بتا الیمینیشن کربوهیدرات‌ها تخلیص شدند و حضور آنها با روش اسیدسولفوریک فنول تایید شد. سمیت سلولی کربوهیدرات‌های تخلیص شده بر رده سلولی LS174T با استفاده از روش MTT به مدت ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: رقت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ کربوهیدرات‌های تخلیص شده از گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای کیست هیداتید به‌طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلول‌های LS174T شد ($P < ۰/۰۵$). ارزیابی سمیت سلولی در مرحله اول نشان داد که کربوهیدرات‌های تخلیص شده از گلیکوپروتئین مایع کیست گوسفند ($۳۸/۶۰ \pm ۱/۳۳$ درصد)، گلیکوپروتئین لایه هیالن کیست گاو ($۳۶/۶۱ \pm ۱/۷۶$ درصد)، گلیکولیپید لایه هیالن کیست گاو ($۳۸/۹۴ \pm ۲/۹۹$ درصد)، گلیکوپروتئین پروتواسکولکس کیست گاو ($۴۰/۲۷ \pm ۳/۶۶$ درصد) و گلیکولیپید پروتواسکولکس کیست گوسفند ($۳۷/۹۴ \pm ۱/۹۹$ درصد) به‌طور معنی‌داری اثرات مهاري بارزتری دارند ($P < ۰/۰۵$). غربالگری بعدی با روش MTT نشان داد که کربوهیدرات‌های تخلیص شده از گلیکوپروتئین‌های جدا شده از مایع کیست هیداتید گوسفند ($۵۲/۳۵ \pm ۱۰/۲۴$ درصد) و گلیکولیپید جدا شده از لایه هیالن کیست هیداتید گاو ($۵۳/۴۰ \pm ۷/۸۱$ درصد) و گلیکولیپید جدا شده از پروتواسکولکس کیست هیداتید گوسفند ($۵۳/۰۵ \pm ۵/۰۶$ درصد) به‌طور معنی‌داری دارای اثرات مهاري بارزتری بر رشد سلول‌های سرطانی LS174T بودند ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: کربوهیدرات‌های جدا شده از گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای لایه هیالن و پروتواسکولکس مایع کیست هیداتید اثر ضدسرطانی قابل توجهی بر رده سلولی سرطان کولورکتال LS174T دارند.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال، کیست هیداتید، اکتینوکوکوس گرانولوزوس، کربوهیدرات

* نویسنده مسؤول: دکتر سارا لرکی، پست الکترونیکی: s.larki@scu.ac.ir

نشانی: اهواز، اتوبان گلستان، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، تلفن: ۳۳۲۲۶۶۰۰ - ۰۶۱ داخلی ۴۲۵۱

وصول ۱۴۰۲/۸/۲۸ اصلاح نهایی ۱۴۰۲/۱۱/۱۰ پذیرش ۱۴۰۲/۱۲/۸ انتشار ۱۴۰۳/۶/۱۹

مقدمه

جدید سرطان کولورکتال گزارش شد که منجر به مرگ ۹۳۵۰۰۰ نفر در سراسر جهان گردید.^۱ علائم سرطان کولورکتال ممکن است شامل تغییرات در عملکرد روده مانند اسهال یا یبوست، خون در مدفوع، درد شکم، و کاهش وزن باشد. با این حال، به خصوص در

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان (بعد از سرطان ریه و پروستات) و دومین سرطان شایع در زنان (بعد از سرطان پستان) محسوب می‌شود.^۱ در سال ۲۰۲۰، حدود ۱/۹ میلیون مورد

مراحل اولیه بیماری برخی از افراد مبتلا به سرطان کولورکتال ممکن است هیچ علامتی نداشته باشند.^۱ در حال حاضر، گزینه‌های درمانی برای سرطان کولورکتال به عوامل مختلفی از جمله محل تومور، مرحله بیماری و سلامت کلی بیمار بستگی دارد. درمان ممکن است شامل جراحی، استفاده از چندین دارو مانند فلوروپیریمیدین، ایرینوتکان، اگزالیلاتین و کپسیتاین، پرتودرمانی، شیمی درمانی یا ترکیبی از آنها باشد.^۲ از یک طرف، بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با عوارض جانبی مرتبط با این گزینه‌های درمانی مواجه هستند.^۳ بنابراین نیاز به روش‌های درمانی با کارایی بالاتر به‌خوبی احساس می‌شود.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی روی دو کبد گوسفند و دو کبد گاو آلوده به کیست هیداتید و رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی (LS174T) خریداری شده از انستیتو پاستور ایران، در بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز سال ۱۴۰۱ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز (EE/1401.2.24.226665/scu.ac.ir) قرار گرفت. در کمیته اخلاق پژوهش بر روی آزمودنی‌ها و مشارکت‌کنندگان انسانی تصویب و مورد تایید معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز قرار گرفت.

تهیه آنتی‌ژن‌های کیست هیداتید گاوی و گوسفندی

تعداد دو کبد گوسفند و دو کبد گاو آلوده به کیست هیداتید تک‌حفره‌ای بارور ناشی از *اکیونوکوکوس گرانولوزوس* در مراحل انتهایی بیماری و حاوی مایع کیست از کشتارگاه‌های استان خوزستان جمع‌آوری گردید. پس از انتقال آنها به بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز در کنار یخ و در شرایط استریل، سطوح کیست‌ها توسط الکل ۷۰ درصد استریل شدند و محتویات درون کیست توسط سرنگ‌های ۲۰ cc جمع‌آوری گردید. مایع کیست‌های جمع‌آوری شده از نظر وجود پروتواسکولکس توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. پس از مشاهده حضور پروتواسکولکس‌ها، محتویات کیست به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به‌عنوان مایع کیست هیداتید با احتیاط خارج و در لوله‌های فالتون نگهداری شدند. رسوب حاصله که پروتواسکولکس‌های جدا شده از مایع کیست بودند تا زمان استفاده در لوله‌های فالتون نگهداری شدند. در ادامه محتویات لوله‌های فالتون حاوی مایع کیست برای استخراج آنتی‌ژن‌های مایع در پتری دیش‌های استریل ریخته و به مدت ۲۴ ساعت تغلیظ و خشک شده و به‌عنوان آنتی‌ژن‌های خام مایع کیست برای مراحل بعدی مطالعه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رسوب پروتواسکولکس‌های فشرده در کف فالتون‌ها چندین

در میان گونه‌های خانواده تنیده که از انگل‌های متداول و شایع جهانی است؛ جنس *اکیونوکوکوس* از نظر بهداشتی و اقتصادی به‌خصوص در جوامع انسانی و دامی حائز اهمیت بالایی است.^۵ معمولاً کیست هیداتید ناشی از *اکیونوکوکوس گرانولوزوس* از یک حفره تشکیل شده و دارای دیواره ضخیمی است. این کیست تک‌حفره‌ای از دو لایه زایا (Germinal layer) و هیالین (Laminated layer) تشکیل شده است. در کیست‌های بارور بر روی غشاء داخلی یا زایای کیست، پروتواسکولکس‌ها قرار دارند. لایه هیالین دارای ساختمانی فشرده و حجیم است که تنها در جنس *اکیونوکوکوس* دیده شده است.^۵ و به‌شدت غنی از ترکیبات کربوهیدرات‌دار است.^۶ ترکیب مونوساکارید این لایه شامل گالاکتوز، N-استیل گالاکتوز آمین و N-استیل گلوکز آمین است.^۷ لایه هیالین، پروتواسکولکس و مایع کیست‌های هیداتید بارور دارای کربوهیدرات‌هایی هستند که قطعاً در شناسایی عوامل بیماری‌زا توسط سیستم ایمنی میزبان نقش محوری داشته و موجب می‌شوند که انگل سیستم ایمنی ذاتی میزبان را در برابر خود کنترل کند و بدین ترتیب کرم می‌تواند سال‌ها در اندام‌های مختلف بدن میزبان بدون هیچ‌گونه التهاب و تحریک سیستم ایمنی مستقر شود.^۸

استفاده از انگل‌ها یا آنتی‌ژن‌های انگل یکی از نوین‌ترین روش‌های درمانی برای سرطان است که هنوز در فاز انسانی مورد استفاده و تایید قرار نگرفته است.^{۹،۱۰} در مطالعات انجام شده روی آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی کیست هیداتید و واکنش متقاطع سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم با این فراکسیون‌های آنتی‌ژنی، آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی کیست هیداتید در همه مراحل کیست یافت شده و فراوانی آنها در لایه هیالین بیشتر مشاهده شده است.^{۱۱،۱۲} حضور همزمان کیست هیداتید و هپاتوسلولار کارسینوما نادر است و به‌نظر می‌رسد *اکیونوکوکوس گرانولوزوس* اثرات حفاظت‌بخشی علیه این سرطان دارد.^{۱۲} آنتی‌ژن‌های کیست هیداتید دارای فعالیت‌های ضد ملانوم هستند و این اثرات مربوط به پاسخ سیستم ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های انگل است.^{۱۳} همچنین فعالیت ضد توموری مایع کیست

بار با محلول نمکی ایزوتونیک (سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد) شسته و سپس به کمک امواج فراصوت سونیکه شدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، مایع درون پتری دیش‌ها خشک شده و تحت شرایط استریل پتری دیش‌ها خارج و به زیر هود منتقل شدند. سپس توسط جسم تیزی مایع خشک شده درون پتری دیش‌ها خراشیده و به صورت پودر درون میکروتیوب‌های کوچک ریخته شد و فراصوت دستگاه سونیکاتور (مدل Bandelin electronic آلمان) به تعداد ۲ پالس ۱۵ ثانیه‌ای سونیکه گردید. این پروتواسکولکس‌های سونیکه شده به‌عنوان آنتی‌ژن‌های خام پروتواسکولکس نیز برای مطالعات بیشتر در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین بخشی از دیواره کیست‌های جمع‌آوری شده؛ پس از برش در ابعاد کوچک‌تر، چندین بار در ترکیب محلول نمک بافر فسفات (PBS) و پنی‌سیلین (300 IU) و استرپتومایسین (۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شسته و به مدت ۲۴ ساعت چندین بار منجمد و ذوب شدند تا به حذف لایه زایا کمک شود.^{۱۵} سپس لایه هیالین را جدا کرده و پس از هموژنیزه کردن، توسط امواج فراصوت به تعداد ۵ پالس ۱۵ ثانیه‌ای و به تعداد ۱۰ پالس ۱۵ ثانیه‌ای به ترتیب برای آنتی‌ژن دیواره هیالین گوسفندی و گاوی سونیکه شد که در نهایت به صورت شیرابه درآمده و به عنوان آنتی‌ژن خام دیواره هیالین کیست در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات آینده نگهداری گردید.

جداسازی ترکیبات گلیکوپروتئین و گلیکولیپید آنتی‌ژن‌های کیست هیداتید گاوی و گوسفندی

آنتی‌ژن‌ها از ترکیب مولکول‌های مختلف مانند پروتئین، پلی‌ساکارید، لیپید، اسیدنوکلئیک و یا مواد دیگر تشکیل شده‌اند. برای جداسازی گلیکوپروتئین و گلیکولیپیدهای آنتی‌ژن‌های جدا شده از سه بخش دیواره هیالین، مایع و پروتواسکولکس‌های خام کیست‌ها از روش استخراج با کلروفرم - متانول ۲۰ استفاده شد. بدین ترتیب که آب مقطر، متانول و کلروفرم به مایعات حاوی آنتی‌ژن‌ها به ترتیب با نسبت ۳:۴:۱ و ۱:۱ افزوده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مجدداً رسوب حاصله در ۴ میلی‌لیتر متانول شناور شده و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به‌عنوان فراکسیون گلیکولیپید و رسوب حاصله به عنوان فراکسیون گلیکوپروتئین جداسازی و ذخیره گردید.

جداسازی کربوهیدرات‌ها از ترکیبات گلیکوپروتئین و گلیکولیپیدی به روش بتا-الیمینیشن (β-elimination)

برای جداسازی کربوهیدرات‌ها از ترکیبات گلیکوپروتئین و گلیکولیپیدی آنتی‌ژن‌های جدا شده از بخش‌های مختلف کیست از روش بتا-الیمینیشن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.^{۱۶} در این روش، ۰/۳۲ گرم هیدروکسید سدیم (NaOH) و ۰/۱۱۲ گرم

سدیم تترا هیدروبورات (NaBH₄) در آب مقطر حل و آنتی‌ژن‌های مختلف جمع‌آوری شده از مایع، لایه هیالین و پروتواسکولکس کیست هیداتید را به آن افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، برای رسوب کربوهیدرات‌های بخش‌های مختلف کیست، این مخلوط را سانتریفیوژ کرده و مایع رویی آن را درون یک بشر ریخته و در مجاورت یخ اقدام به تغییر pH کرده که ابتدا pH محلول را با افزودن اسیدکلریدریک غلیظ یک‌بار به یک رسانده و در ادامه با افزودن هیدروکسید سدیم pH محلول را به ۷ رساندیم. در پایان برای جداسازی کربوهیدرات‌های حاصله، محلول به‌دست آمده را در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته و با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی را جدا کرده و رسوب حاصل با افزودن مقداری آب مقطر جمع‌آوری و در فریزر با دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه و تخلیص آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی کیست هیداتید

کیسه‌های دیالیز (12 kD) را پس از برش‌های مساوی درون بافر فعال کننده (حاوی EDTA و بی‌کربنات سدیم) گذاشته؛ پس از ۱۵ دقیقه در دمای جوش، با آب مقطر شستشو داده؛ سپس نمونه‌های آنتی‌ژنی گلیکولیپیدی و گلیکوپروتئینی گاوی و گوسفندی را به کیسه‌های دیالیز فعال شده منتقل نمودیم و درون ظرف‌های یک لیتری حاوی ۹۶۰ cc آب مقطر و ۴۰ cc بافر فسفات به صورت معلق قرار گرفتند تا توسط این کیسه‌ها ناخالصی‌هایی مثل نمک و ذرات موجود در نمونه خارج و وارد محلول شوند. این ظروف حاوی کیسه‌های دیالیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری و بعد از این مرحله محتویات کیسه‌ها در میکروتیوب‌های جداگانه‌ای ریخته شدند و در فریزر با دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی کربوهیدرات‌ها در آنتی‌ژن جدا شده از کیست هیداتید با روش فنول - اسیدسولفوریک

به‌منظور تایید وجود کربوهیدرات در هر یک از محلول‌های آنتی‌ژنی جدا شده از کیست از روش فنول اسیدسولفوریک استفاده شد. روش فنول اسیدسولفوریک یک روش رنگ‌سنجی ساده و سریع برای ارزیابی وجود کربوهیدرات در یک نمونه است. در این روش اکثر کربوهیدرات‌ها از جمله مونوساکارید، دی‌ساکارید و اولیگوساکاریدها قابل شناسایی هستند. اسیدسولفوریک موجود در این روش، کربوهیدرات‌ها را به واحدهای کوچک‌تر آن یعنی مونوساکاریدها می‌شکند. سپس قندهای پنج کربنه (پنتوز) به فورفورال و قندهای شش کربنه (هگزوز) به هیدروکسی متیل فورفورال دهیدراته تبدیل می‌شوند. این ترکیبات سپس با فنل واکنش داده و رنگ زرد طلایی ایجاد شده که این رنگ تا چند ساعت پایدار باقی می‌ماند. با خواندن جذب ترکیب رنگی هر نمونه

توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون تک‌نمونه‌ای کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شدند. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار مقادیر جذب کربوهیدرات‌های تخلیص شده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده از قسمت‌های مختلف کیست هیداتید طی سه تکرار مستقل در جدول یک آمده است.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار مقادیر جذب کربوهیدرات‌های تخلیص شده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده از قسمت‌های مختلف کیست هیداتید طی سه تکرار مستقل

شماره نمونه	نام نمونه	میانگین و انحراف معیار (mg/mL)
۱	گلیکوپروتئین پروتواسکولکس گاو	۳/۱۲±۰/۱۵
۲	گلیکوپروتئین پروتواسکولکس گوسفند	۴/۷۰±۰/۱۲
۳	گلیکوپروتئین مایع گاو	۲/۲۹±۰/۰۳
۴	گلیکوپروتئین مایع گوسفند	۴/۸۰±۰/۰۲
۵	گلیکوپروتئین لایه هیالین گاو	۴/۸۵±۰/۳۱
۶	گلیکوپروتئین لایه هیالین گوسفند	۲/۳۰±۰/۰۴۸
۷	گلیکولیپید پروتواسکولکس گاو	۴/۷۷±۰/۱۶
۸	گلیکولیپید پروتواسکولکس گوسفند	۳/۵۷±۰/۲۰
۹	گلیکولیپید مایع گاو	۴/۴۸±۰/۲۲
۱۰	گلیکولیپید مایع گوسفند	۳/۴۹±۰/۱۲
۱۱	گلیکولیپید لایه هیالین گاو	۵/۳۱±۰/۱۹
۱۲	گلیکولیپید لایه هیالین گوسفند	۴/۱۰±۰/۲۰

اثرات کربوهیدرات‌های تخلیص شده با رقت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ از آنتی‌ژن‌های قسمت‌های مختلف کیست هیداتید بر رشد رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی (LS174T) پس از ۲۴ ساعت ($P < ۰/۰۵$) در جدول ۲ آمده است. تنها رقت ۰/۵ کربوهیدرات استخراج شده از گلیکولیپید لایه هیالین کیست هیداتید گوسفند بر رشد رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی اثر آماری معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲). کربوهیدرات‌های تخلیص شده از گلیکوپروتئین‌های جدا شده از مایع کیست هیداتید گوسفند، گلیکولیپید جدا شده از پروتواسکولکس کیست هیداتید گوسفند، گلیکولیپید جدا شده از لایه هیالین کیست هیداتید گاو، گلیکوپروتئین جدا شده از لایه هیالین کیست هیداتید گاو و گلیکوپروتئین جدا شده از پروتواسکولکس کیست هیداتید گاو بیشترین اثرات مهاري را بر رشد سلول‌های LS174T نشان دادند (جدول ۲). برای غربالگری بیشتر، اثرات مهاري کربوهیدرات‌های تخلیص شده از این پنج آنتی‌ژن بر رشد سلول‌های سرطانی LS174T مجدداً با روش MTT ارزیابی گردید و کربوهیدرات‌های تخلیص شده از پنج آنتی‌ژن انتخاب شده به‌طور معنی‌داری منجر به مهار رشد سلول‌ها گردید. کربوهیدرات‌های تخلیص شده از گلیکوپروتئین‌های جدا شده از مایع کیست هیداتید گوسفند، گلیکولیپید جدا شده از پروتواسکولکس کیست هیداتید

در طول موج مشخص به وجود کربوهیدرات در نمونه آنتی‌ژنی کیست می‌توان دست یافت. بدین ترتیب ۲۵ میکرولیتر از هر ۱۲ نوع آنتی‌ژن‌های گلیکولیپیدی و گلیکوپروتئینی گاوی و گوسفندی رسوب داده شده با ۱۵ میکرولیتر فنل ۵ درصد (محلول در آب مقطر) مخلوط کرده، سپس به میزان ۷۵ میکرولیتر اسیدسولفوریک غلیظ (با خلوص ۹۸ درصد) به‌صورت عمود بر سطح مایع به آن اضافه گردید. پس از نگهداری این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه، میزان جذب محلول‌های آنتی‌ژنی در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 4700, USA) خوانده شد.^{۱۷} اندازه‌گیری جذب همه نمونه‌ها با سه تکرار مستقل صورت گرفت.

ارزیابی سمیت سلولی کربوهیدرات‌های تخلیص شده از آنتی‌ژن‌های جدا شده از کیست هیداتید بر سلول‌های سرطان کولورکتال با روش MTT

رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی (LS174T) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای تکثیر و کشت رده سلولی سرطانی از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد پنی‌سیلین - استرپتومایسین در شرایط استاندارد انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کربن دی‌اکسید ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد) استفاده گردید. برای سنجش میزان سمیت سلولی کربوهیدرات‌های دوازده آنتی‌ژن گلیکولیپیدی و گلیکوپروتئینی گاوی و گوسفندی بر سلول‌های سرطانی کولورکتال از روش متیل-تترازولیوم (MTT) استفاده شد. به‌طور خلاصه 5×10^3 سلول در هر چاهک یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوباتور به آنها اجازه چسبندگی داده شد. سپس سلول‌ها با رقت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ کربوهیدرات‌های تخلیص شده تحت تیمار قرار گرفتند. در نهایت محیط کشت خارج شد و به دنبال آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، سیگما) به هر چاهک اضافه شد. پلیت بلافاصله به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از جایگزینی محلول MTT با ۶۰ میکرولیتر DMSO در هر چاهک، جذب هر چاهک (۵۷۰ نانومتر) با یک دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 4700, USA) تعیین شد.

برای بررسی مجدد و غربالگری بهتر آنتی‌ژن‌ها، سمیت سلولی کربوهیدرات‌های تخلیص شده از پنج آنتی‌ژن با بیشترین سمیت سلولی بر رده سلولی LS174T مجدداً با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. مانند مرحله قبل سلول‌ها با رقت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ کربوهیدرات‌های تخلیص شده به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند.

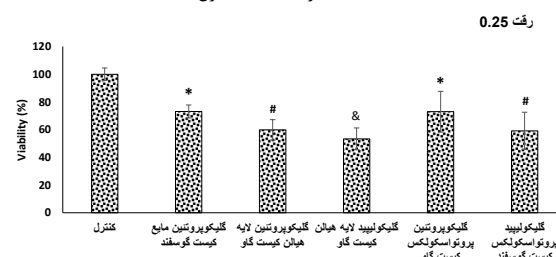
آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پرسم نسخه ۸ انجام شد. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شدند.

گوسفند و گلیکولیپید جدا شده از لایه هیالان کیست هیداتید گاو بیشترین اثرات مهاری را بر رشد سلول‌های سرطانی LS174T نشان دادند (نمودار یک).

جدول ۲: اثر مهاری کربوهیدرات‌های تخلیص شده با رقت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ آنتی‌ژن‌های قسمت‌های مختلف کیست هیداتید بر رشد رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی (LS174T) پس از ۲۴ ساعت

آنتی‌ژن‌های استخراج شده از بخش‌های مختلف کیست هیداتید	میانگین و انحراف معیار درصد کشندگی	
	رقت ۰/۵	رقت ۰/۲۵
کنترل	۱۰۰	۱۰۰
گلیکوپروتئین پروتواسکولکس گاو (GPXC)	۴۰/۲۷±۳/۶۶ *	۷۹/۸۷±۹/۹۸ *
گلیکوپروتئین مایع گوسفند (GPFS)	۴۰/۶۰±۰/۶۶ *	۳۸/۶۰±۱/۳۳ *
گلیکولیپید پروتواسکولکس گوسفند (GLXS)	۵۶/۱۳±۱۶/۶۶ *	۷۹/۲۰±۲/۳۲ *
گلیکوپروتئین لایه هیالان گاو (GPLC)	۴۶/۲۶±۸/۳۱ *	۳۶/۶۱±۱/۷۶ *
گلیکولیپید لایه هیالان گاو (GLLC)	۳۸/۹۴±۲/۹۹ *	۴۸/۱۴±۴/۴۳ *
گلیکوپروتئین مایع گاو (GPFC)	۷۴/۸۸±۰/۳۳ *	۳۵/۵۰±۱/۰۱ *
گلیکولیپید مایع گاو (GLFC)	۳۸/۹۴±۴/۳۲ *	۳۷/۹۴±۱/۹۹ *
گلیکولیپید پروتواسکولکس گاو (GLXC)	۴۸/۵۹±۹/۳۱ *	۴۲/۹۳±۲/۹۹ *
گلیکوپروتئین لایه هیالان کیست گوسفند (GPLC)	۶۷±۶/۱۸ *	۷۶/۸۷±۹/۹۸ *
گلیکوپروتئین پروتواسکولکس گوسفند (GPXS)	۷۳/۸۸±۶/۶۵ *	۳۵/۲۷±۰/۶۶ *
گلیکولیپید لایه هیالان گوسفند (GLLS)	۹۰/۵۲±۱/۳۳ *	۴۷/۲۵±۵/۹۹ *
گلیکولیپید مایع گوسفند (GLFS)	۴۳/۹۳±۸/۶۵ *	۵۷/۲۴±۱۴/۶۴ *

* P<۰/۰۵ در مقایسه با کنترل



نمودار ۱: اثر مهاری کربوهیدرات‌های تخلیص شده (رقت ۰/۲۵) از پنج آنتی‌ژن انتخابی جدا شده از قسمت‌های مختلف کیست هیداتید بر سلول‌های LS174T پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با کنترل طی MTT مورد ارزیابی قرار دادیم. در مقایسه با کنترل * P<۰/۰۵، # P<۰/۰۱، & P<۰/۰۰۱ در مقایسه با کنترل

بحث

در مطالعه حاضر، دوازده آنتی‌ژن شامل گلیکو پروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای لایه هیالان، پروتواسکولکس و مایع کیست هیداتید در کبد گوسفند و گاو استخراج شد. بعد از تخلیص کربوهیدرات‌ها از این آنتی‌ژن‌ها، سمیت آنها را بر سلول‌های سرطانی کولورکتال (LS174T) با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار دادیم. در مرحله اول، نتایج نشان داد که کربوهیدرات‌های تخلیص شده از آنتی‌ژن‌های جدا شده از کیست به‌طور معنی‌داری باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی کولورکتال شده‌اند. به نظر می‌رسد که کربوهیدرات‌های تخلیص شده از پنج آنتی‌ژن گلیکوپروتئین مایع کیست گوسفند، گلیکوپروتئین لایه هیالان کیست گاو، گلیکولیپید لایه هیالان کیست گاو، گلیکوپروتئین پروتواسکولکس کیست گاو و گلیکولیپید پروتواسکولکس کیست گوسفند بیشترین اثرات مهاری

را بر رشد سلول‌ها داشتند. برای غربالگری بیشتر، اثرات ضدسرطانی کربوهیدرات‌های تخلیص شده از پنج آنتی‌ژن فوق را مجدداً توسط تکنیک MTT بر سلول‌های سرطانی کولورکتال مورد ارزیابی قرار دادیم. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌ها با کربوهیدرات‌های تخلیص شده از گلیکوپروتئین‌های جدا شده از مایع کیست هیداتیک هیداتید گوسفند، گلیکولیپید پروتواسکولکس کیست هیداتید گوسفند و گلیکولیپید لایه هیالان کیست هیداتید گاو بیشترین اثرات مهاری را بر رشد سلول‌های سرطانی را به دنبال خواهد داشت.

کیست هیداتید ناشی از اکتینوکوکوس گرانولوزوس دارای اثرات ضد سرطانی است. به‌عنوان مثال اثرات ضدسرطانی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید بر سلول‌های فیروسارکوما مورد مطالعه قرار گرفته است.^{۱۸} پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید از تکثیر رده‌های سلولی WEHI 160 و BHK جلوگیری کرده و باعث القای مرگ سلولی در آنها شده است.^{۱۹} در مطالعه دیگری گزارش شد که انتقال غیرفعال سلول‌های طحال موش با آنتی‌ژن‌های کیست هیداتید به موش‌های مبتلا به سرطان ملانوما، باعث کاهش رشد تومور در مقایسه با گروه شاهد شده است.^۹ در مطالعه دانش‌پور و همکاران اثر فراکسیون‌های مختلف مایع کیست هیداتید بر میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی پستان انجام شد. آنها دریافتند که فراکسیون‌های ۷۸ کیلودالتونی و گلیکوپروتئینی مایع کیست باعث القای آپوپتوز در بیش از ۴۰ درصد سلول‌های سرطانی می‌شود. در حالی که آنتی‌ژن‌های گلیکولیپیدی و مایع کیست هیداتید به ترتیب باعث القای آپوپتوز در ۳۹ درصد و ۳۴ درصد سلول‌های سرطانی گردید.^{۱۹} همچنین یوسفی دارانی و همکاران اثرات ضدسرطانی فراکسیون‌های مختلف کیست هیداتید بر ملانوما را مطالعه کردند. آنها نشان دادند که فراکسیون‌های آنتی‌ژنی مایع کیست، پروتواسکولکس‌های خام و دیواره سلولی به ترتیب موجب کاهش اندازه تومورهای ملانوما به میزان ۶۲۲، ۶۹۱ و ۵۷۵ میلی‌مترمربع در موش نژاد BALB/c خواهد شد.^{۲۰} از طرفی محققین نشان داده‌اند که حضور همزمان کیست هیداتید و هپاتوسلولار کارسینوما نادر است و اکتینوکوکوس گرانولوزوس ممکن است اثرات ضدسرطانی بر این هپاتوسلولار کارسینوما داشته باشد.^{۲۱} این شواهد نشان داد که اکتینوکوکوس گرانولوزوس ممکن است اثر محافظتی در برابر انواع سرطان‌ها در شرایط برون‌تنی (In vitro) و درون‌تنی (In vivo) ایجاد کند؛ اما تاکنون مطالعه جامعی در خصوص اثرات ضدسرطانی کربوهیدرات‌های جدا شده از قسمت‌های مختلف کیست هیداتید انجام نشده است و در مطالعه حاضر، کربوهیدرات‌ها از آنتی‌ژن‌های جدا شده از قسمت‌های مختلف کیست هیداتید تخلیص شدند و اثرات ضدسرطانی آنها بر رده سلولی سرطان کولورکتال LS174T ارزیابی شد.

هیداتید مرتبط با توقف سیکل سلولی و القای آپوپتوز در رده سلولی LS174T باشد و این فرضیه نیاز به بررسی بیشتر در مطالعات آتی دارد. پیشنهاد می‌شود که اثرات ضدسرطانی کربوهیدرات‌های تخلیص شده از کیست هیداتید بر سرطان کولورکتال در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار گرفته و فراخوانی سیستم ایمنی علیه سلول‌های سرطانی توسط کربوهیدرات‌ها ارزیابی شود. همچنین پیشنهاد می‌شود مکانیسم‌های زیرسلولی مرتبط با اثرات ضدسرطانی این کربوهیدرات‌ها در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد. همچنین، ارزیابی اثرات ضدسرطانی کربوهیدرات‌های کیست هیداتید در مدل‌های حیوانی با چشم‌انداز استفاده در کارآزمایی‌های بالینی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که کربوهیدرات‌های جدا شده از گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای لایه هیالین و پروتواسکولکس مایع کیست هیداتید اثر ضدسرطانی قابل توجهی بر رده سلولی سرطان کولورکتال LS174T دارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم زهرا جعفری برای اخذ درجه دکتری در رشته انگل شناسی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز بود. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت مالی، تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. بین نویسندگان تضاد منافی وجود ندارد.

References

1. Sinicrope FA. Increasing Incidence of Early-Onset Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Apr;386(16):1547-58. doi: 10.1056/NEJMr2200869.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
3. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Mar;5(1):22. doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.
4. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi J, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar;14(7):1732. doi: 10.3390/cancers14071732.
5. Díaz A, Casaravilla C, Allen JE, Sim RB, Ferreira AM. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. *Trends Parasitol*. 2011 Jun;27(6):264-73. doi: 10.1016/j.pt.2011.01.008.
6. Casaravilla C, Díaz A. Studies on the structural mucins of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Mol Biochem Parasitol*. 2010 Dec;174(2):132-36. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.07.008.
7. Korc I, Hierro J, Lasalvia E, Falco M, Calcagno M. Chemical characterization of the polysaccharide of the hydatid membrane

علی‌رغم تلاش‌های بسیار محققان، اطلاعات کمی در مورد مکانیسم‌های ضدسرطانی ناشی از/کینوکوکوس گرانولوزوس وجود دارد. مکانیسم‌های بالقوه‌ای که پیشنهاد شده است شامل اثر ضدسرطانی مستقیم ناشی از مولکول‌های انگل و اثر غیرمستقیم سرطانی از طریق فعال‌شدن پاسخ ایمنی میزبان است. اثر مهارکننده‌های قوی مانند پروتئاز Kunitz type protease inhibitor EgKI-1 و نوتروفیل الاستاز به‌طور مستقیم و به‌شدت توسط انکوسفر/کینوکوکوس گرانولوزوس بیان می‌شوند که می‌توانند از رشد چندین سرطان انسانی جلوگیری کنند.^{۲۱} در اثرات غیرمستقیم، کیست هیداتید موجب فراخوانی سیستم ایمنی علیه سلول‌های سرطانی می‌شود. به‌عنوان مثال، شباهت آنتی‌ژنی به‌ویژه ۰-گلیکان‌های نوع موسین بین چند انگل و سلول‌های سرطانی مشخص شده است.^{۲۲} مایع کیست هیداتید و آنتی‌ژن B موجب افزایش بیان ژن CD86 و کاهش بیان ژن CD1a می‌شود.^{۱۳} علاوه براین، مایع کیست هیداتید روی تمایز سلول‌های منوسیت انسانی به دندریتیک سل‌ها نقش داشته و نشان داده شده که مایع کیست هیداتید بیان CD14 را افزایش داده و بیان CD1a را کاهش می‌دهد.^{۱۴} لذا آنتی‌ژن‌های کیست هیداتید در تحریک سیستم ایمنی سلولی نقش داشته و می‌تواند از این طریق اثرات ضدسرطانی خود را اعمال نماید. نتایج مطالعه حاضر در راستای دیگر مطالعات^{۹،۸} بوده که نشان‌دهنده اثرات ضدسرطانی کیست هیداتید است. ما فرض کردیم که اثرات ضدسرطانی کربوهیدرات‌های تخلیص شده از گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای قسمت‌های مختلف کیست

of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol*. 1967 Apr;20(2):219-24. doi: 10.1016/0014-4894(67)90041-0.

8. Díaz A, Casaravilla C, Irigoín F, Lin G, Previato JO, Ferreira F. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol*. 2011 Jun;27(5):204-13. doi: 10.1016/j.pt.2010.12.012.
9. Ramazninia ST, Sharafi SM, Bahadoran M, Jafaei Nodeh F, Mahmoudzadeh M, Yousofi Darani H. Effect of Passive Transfer of Spleen Cells from Immunized Mice With Hydatid Cyst Antigens on the Growth of Melanoma Cancer in C57/Black Mice. *British Journal of Medicine & Medical Research*. 2016;16(7):1-6. doi: 10.9734/BJMMR/2016/26744.
10. Chookami MB, Sharafi SM, Sefiddashti RR, Jafari R, Bahadoran M, Pestechian N, Yousofi Darani H. Effect of two hydatid cyst antigens on the growth of melanoma cancer in C57/black mice. *J Parasit Dis*. 2016 Dec;40(4):1170-73. doi: 10.1007/s12639-015-0643-7.
11. Daneshpour S, Bahadoran M, Hejazi SH, Eskandarian AA, Mahmoudzadeh M, Darani HY. Common antigens between hydatid cyst and cancers. *Adv Biomed Res*. 2016 Jan;5:9. doi: 10.4103/2277-9175.175242.
12. Rafii Sefid Dashti R, Yousef Darani H, Ebrahimi SA, Hook R, Akhlaghi L, Eskandarian AA. [Examination of carbohydrate antigens of hydatid cyst and cross-reaction of serum of breast cancer patients and healthy individuals with these antigenic fractions]. *Dissertaion. School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences*. 2016. [Persian]

13. Riganò R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, et al. Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1667-78. doi: 10.1128/IAI.01156-06.
14. Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology*. 2006 Jun;118(2):271-78. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02375.x.
15. Mandong BM, Ngbea JA, Raymond V. Role of parasites in cancer. *Niger J Med*. 2013 Apr-Jun;22(2):89-92.
16. Gahmberg CG, Hakomori SI. External labeling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes. *J Biol Chem*. 1973 Jun;248(12):4311-17.
17. Conrad HE. Beta-elimination for release of O-linked glycosaminoglycans from proteoglycans. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001 May;Chapter 17:Unit17.15A. doi: 10.1002/0471142727.mb1715as31.
18. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*. 1956;28(3):350-56. doi: 10.1021/ac60111a017.
19. Daneshpour S, Kefayat AH, Mofid MR, Rostami Rad S, Yousofi Darani H. Effect of Hydatid Cyst Fluid Antigens on Induction of Apoptosis on Breast Cancer Cells. *Adv Biomed Res*. 2019 Apr;8:27. doi: 10.4103/abr.abr_220_18.
20. Yousofi Darani H, Jafaei Nodeh F, Ramazaninia ST, Sharafi SM. Effect of Immune Responses Against Hydatid Cyst Antigens on Growth of Melanoma Tumor. *Immunoregulation*. 2019;1(2):107-12. doi: 10.32598/Immunoregulation.1.2.101.
21. Ranasinghe SL, Fischer K, Zhang W, Gobert GN, McManus DP. Cloning and Characterization of Two Potent Kunitz Type Protease Inhibitors from *Echinococcus granulosus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Dec;9(12):e0004268. doi: 10.1371/journal.pntd.0004268.
22. Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life*. 2007 Apr-May;59(4-5):269-73. doi: 10.1080/15216540601188553.