زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۲، صفحات ۱۷۳-۱۶۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره گیاه زیتون تلخ (*Melia azedarach*) و کروسین در موش‌های مبتلا به کیست هیداتید

راهله رهباریان[1*]، سیده شهربانو جعفری[2]، حمید عشرتی[1]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

*مسئول مکاتبات: a_rahbarian@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸

DOI: 10.22034/ascij.2023.1981914.1475

چکیده

کیست هیداتید یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است. در مطالعه حاضر، اثر درمانی عصاره دانه گیاه زیتون تلخ و کروسین بر روی مدل موش آلوده به کیست هیداتید در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی برون‌تنی از روش رنگ آمیزی ائوزین ۰/۱ درصد استفاده شد. در بررسی درون‌تنی ۳۰ سر موش آزمایشگاهی با تزریق داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع حاوی ۲۰۰۰ پروتواسکولکس به کیست هیداتید الوده شدند. یک هفته پس از تزریق موش‌ها بطور تصادفی در قفس‌های مجزای به ۵ گروه ٦ تایی درمانی تقسیم شدند. این گروها شامل: ۱- گروه شاهد (بدون هیچ نوع تیماری)، ۲- گروه آلبندازول (دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم آلبندازول)، ۳- گروه زیتون تلخ (۱۰۰ ماکرولیتر عصاره زیتون تلخ)، ٤- گروه کروسین (۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر کروسین)، ۵- گروه زیتون تلخ –کروسین (مخلوطی از عصاره زیتون تلخ و کروسین). ۱٤۰ روز بعد از درمان، آزمایشات مورد نظر انجام شد. بررسی برون‌تنی اثر کشندگی عصاره خالص زیتون تلخ بر پروتواسکولکس‌ها نشان داد که پس از ۱۵ و ٦۰ دقیقه انکوباسیون بترتیب ٦۰ و ۸۰ درصد پروتواسکولکس‌ها از بین می‌روند. نتایج آزمایشات درون‌تنی نیز نشان داد که در گروه‌های تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین، تعداد، وزن و اندازه کیست‌های هیداتید در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است. علاوه‌براین، بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی کبدی بیشترین اثر کشندگی کیست هیداتید را درگروه‌های تحت درمان با زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین در مقایسه با گروه تحت درمان با داروی ضد انگل آلبندازول و شاهد نشان داد.

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، عصاره زیتون تلخ، کروسین، فاکتورهای بیوشیمیایی.

مقدمه

کیست هیداتید از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام در جهان و ایران است. انگل بالغ یکی از سستودهای روده باریک گوشتخواران است و نوزاد آن در اندام‌های مختلف پستانداران و انسان زندگی می‌کند و کیست هیداتید نامیده می‌شود. چرخه زندگی این انگل غیرمستقیم است و به منظور تکمیل چرخه زندگی خود به دو میزبان نیازمند دارد. کرم بالغ در روده سگ و سگ‌سانان به عنوان میزبان اصلی زندگی می‌کند، انسان و دام‌ها از جمله گوسفند، بز و گاو نقش میزبان واسط انگل را دارند (۲۷). تخم‌های انگل

در محیط بسیار مقاوم هستند، به طوری که در دمای ۲ درجه سانتیگراد به مدت یک سال زنده می‌مانند. نشخوارکنندگان اهلی و وحشی به عنوان میزبانان واسط اکینوکوکوس گرانولوزوس، تخم‌ها را به طور تصادفی می‌بلعند و مراحل لاروی (متاسستود) در انداهای داخلی آن‌ها توسعه می‌یابد، ایجاد کیست می‌کند و باعث ضایعات شدیدی می‌شود. در صورتی که انسان تخم کرم را بطور تصادفی همراه با دست آلوده، آب آلوده و یا موادغذایی آلوده ببلعد کیست در اندام‌های مختلف بدن انسان تشکیل می‌شود. این بیماری در تمامی نقاط جهان به جز مناطق قطبی پراکنده است اما در کشورهای آسیای میانه، خاورمیانه، کرانه مدیترانه، شمال آفریقا، کنیا، آسیای جنوب غربی، اوگاندا، آمریکای جنوبی، استرلیا و زلاندنو شیوع بالاتری دارد. شدیدترین مراحل لاروی زندگی انگل از لحاظ بیماریزایی، مرحله لاروی اکینوکوکوس گرانولوزوس می‌باشد که کیست هیداتید نامیده می‌شود، کیست هیداتید درون اندام‌های مختلف میزبانان واسط مانند کبد، ریه، مغز و نخاع ایجاد می‌شود. کیست‌های کبدی و ریوی شایع‌ترین تظاهرات بیماری می‌باشند (۲۳). ابتلا به این بیماری در انسان گاهی می‌تواند ضایعات شدید و غیر قابل جبران و حتی مرگ شود (۲۸). در حال حاضر بهترین روش درمان، جراحی می‌باشد که این روش عوارض جانبی و یا عود مجدد بیماری را می‌تواند به همراه داشته باشد. در روش PAIR (Puncture, Aspiration, Injection, Respiration) ابتدا مایع داخل کیست را کشیده و سپس یک ماده کشنده پروتواسکولکس به داخل کیست تزریق شده و مجددا تخلیه می‌شود (۲۳). در درمان دارویی از داروهایی نظیر آلبندازول، مبندازول و پرازیکوانتل استفاده می‌شود که کاربرد گسترده‌ای در درمان بیماری‌های انگلی دارد. درمان با این داروها ۱۰ تا ۳۰ درصد موفقیت آمیز، ۴۰ تا ۶۰ درصد بهبود نسبی و در بقیه موارد موثر واقع نمی‌شود. در انسان این داروها با دوزهای بالا و طولانی مدت باعث عوارض جانبی زیادی می‌شود (۲۸). بطور کلی با توجه به عوارض حاصل از مصرف داروها و ایجاد مقاومت دارویی، تحقیقات به منظور دستیابی به داروهای گیاهی که تاثیر بهتر و عوارض کمتری داشته باشند اهمیت زیادی در تعمین سلامت انسان و حیوان دارد. مطالعات صورت گرفته بر روی عصاره سیر نشان داد که غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره سیر در مدت زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه موجب از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها به میزان ۸۷/۹، ۹۵/۶، ۹۶/۸، ۹۸/۷، ۹۹/۶ و ۱۰۰ درصد می‌شود (۱۳). همچنین نشان داه شده است که عصاره اتانولی موم با غلظتی نزدیک به ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۳ دقیقه موجب غیرفعال شدن پروتواسکولکس‌ها می‌شود (۲۴). علاوه بر این مشاهده شده است که عصاره متانولی میوه سمبوکس ابولوس بر پروتواسکولکس‌ها تاثیر به سزایی دارد، بطوریکه این ماده در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در مدت زمان ۶۰ دقیقه موجب کشندگی پروتواسکولکس‌ها می‌گردد (۴). اثر کشندگی عصاره سماق در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی-لیتر در مدت زمان‌های ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ دقیقه به ترتیب ۹۴ و ۹۷ و ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۱۴). گیاهان ریحان و پیاز هر کدام در غلظت ۱۰ درصد در مدت زمان ۶۰ دقیقه به ترتیب واجد ۲۴ و ۱۶ درصد اثر ضعیف کشندگی بوده‌اند (۱۴). مطالعات نشان داده است که میوه درخت زیتون تلخ دارای خواص ضد انگلی، ضد قارچی و ضد باکتریایی می‌باشد و علاوه بر این از گذشته در طب سنتی چین استفاده می‌شده است (۱۷). درخت زیتون تلخ با نام علمی *Melia azedarach* از خانواده *Meliacea* مشتمل بر دو گونه است شامل، azedarach و

azadirachta ، که خانواده *Melia azedarach* بهترین گونه شناخته شده است (۲٤). ترکیبات موجود در زیتون تلخ بسیار پیچیده است، ترکیبات شیمیایی آن ۳ تا ٤ ترکیب اصلی است و بیش از ۲۰ نوع ترکیب دیگر به مقادیر کمتر وجود دارد که به همان اندازه مفید هستند، که موثرترین آنها که به طور فراوان هم وجود دارد تری‌ترپن‌ها می‌باشد. این ترکیبات به طور عمده شامل لیمنوئیدها هستند که در مهار رشد حشرات موثر روی سلامت انسان نقش دارند (۱۱). از جمله این لیمنوئیدها آزادی راکتین نام دارد که در دانه‌های زیتون تلخ یافت می‌شود و ماده اصلی موثر برای مبارزه با حشرات و آفات است که تا ۹۰ درصد کارایی دارد. این ماده باعث اختلال در چرخه زندگی و رشد حشرات می‌شود (۱۵). آزادی راکتین به علت خاصیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد تکثیری خود مورد توجه خاصی قرار گرفته است و در درمان سرطان رحم نیز بکار می رود (۲۰). گیاه کروسین یا زعفران دارای مصارف درمانی و غذایی بوده و منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله فلاونوئیدها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها (ریبوفلاوین و تیامین)، آمینواسیدها، مینرال‌ها، صمغ‌ها و همچنین کاروتنوئیدهایی مثل کروسین، پیروکسین و سافرانال می‌باشد. زعفران به عنوان یک گیاه دارویی برای درمان اختلالات معدی و سوء هاظمه و همچنین افزایش اشتها و ضد اسپاسم به کار می‌رود. همچنین زعفران دارای اثرات کاهش چربی خون، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان و ضدسرطانی می‌باشد. این اثرات به طور عمده ناشی از عوامل آنتی‌اکسیدان زعفران از جمله سافرانال، پیروکسین و مواد رنگی (به عنوان مثال کروتین و گلیکوزید و کروسین) می‌باشد. عصاره کروسین در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو در موش‌های صحرایی مفید می‌باشد (۸). با توجه به موارد ذکر شده درباره خواص زیتون تلخ و کروسین و با توجه به اهمیت دست یابی به داروهایی با منشا گیاهی که دارای عوارض کمتر و اثر بهتری علیه کیست هیداتید باشند، در تحقیق حاضر اثر درمانی عصاره دانه زیتون تلخ و کروسین بر روی مدل موشی آلوده به کیست هیداتید در شرایط برون‌تنی و درون-تنی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری پروتواسکولکس‌ها: کبدهای آلوده به کیست هیداتید گوسفند ذبح شده از کشتارگاه جمع-آوری شدند و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. ابتدا سطح کبدها با آب شسته و بعد با پنبه و گاز استریل آبگیری شد. سپس به وسیله الکل ۷۰ درصد و نیز با استفاده از اسکالپل داغ شده روی شعله، سطح مورد نظر میکروب زدایی و ضد عفونی گردید. سپس در شرایط استریل با استفاده از سرنگ مایع داخل کیست کشیده شد و به داخل فالکون منتقل شد. فالکن ها سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند تا پروتواسکولکس‌ها ته نشین شوند سپس مایع رویی تخلیه و رسوب پایینی سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و جمع آوری شد.

تهیه عصاره میوه گیاه زیتون تلخ و کروسین: میوه زیتون تلخ از درختان جمع‌آوری شد و در دمای اتاق به مدت چند هفته نگهداری شد تا کاملا خشک شود. میوه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب پودر شدند و سپس روغن آنها بوسیله دستگاه سوکسله و با استفاده از حلال هگزان به نسبت ۱ به ٤ تهیه گردید که با حذف هگزان روغن مورد نظر بدست آمد. عصاره کروسین به صورت تجاری و آماده از شرکت Sigma-Aldrich, France و با غلظت ۲۰۰ میلی-گرم/میلی‌لیتر خریداری گردید.

بررسی تاثیر زیتون تلخ بر پروتواسکولکس کیست هیداتید در شرایط برون‌تنی: ابتدا تست زنده مانی

پروتواسکوکس‌ها با استفاده از رنگ ائوزین ۰/۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت که میزان زنده مانی آنها حدود ۹۰ درصد تعیین گردید. سپس جهت بررسی تاثیر عصاره زیتون تلخ بر پروتولسکولکس‌های کیست هیداتید، غلظت‌های، ۱۰۰، ۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰، از عصاره زیتون تلخ با بافر فسفات سالین تهیه گردید. در مرحله بعد ۲۰۰ ماکرولیتر از زیتون تلخ، داخل میکروتیوب ریخته شد و به آن ۲۰۰ ماکرولیتر ائوزین ۰/۱ درصد اضافه شد و میزان زنده‌مانی آنها پس از ۱۵ و ۶۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت.

آلوده‌سازی موش‌های آزمایشگاهی: پس از شستشوی پروتواسکولکس‌ها و بررسی تست زنده مانی آنها، آنتی بیوتیک پنی سلین و استرپتومایسین به آنها اضافه شد و سپس با بافر فسفات سالین به حجمی رسانده شد که در هر ۰/۵ میلی‌لیتر آن حدود ۲۰۰۰ پروتواسکولکس موجود باشد. در ادامه ۳۰ سر موش آزمایشگاهی ماده با وزنی حدود ۳۵ تا ۳۷ گرم و سنی حدود ٤ تا ٦ هفته، با تزریق داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع حاوی ۲۰۰۰ پروتواسکولکس به کیست هیداتید الوده شدند.

درمان موش‌های آزمایشگاهی: یک هفته پس از تزریق موش‌ها بطور تصادفی در قفس‌های مجزای به ۵ گروه ٦ تایی درمانی تقسیم شدند. این گروها شامل: ۱) گروه شاهد که هیچ نوع تیماری را دریافت نکرد، ۲) گروه آلبندازول، که دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم آلبندازول را دریافت می‌کردند، ۳) گروه زیتون تلخ، که ۱۰۰ ماکرولیتر عصاره خالص زیتون تلخ را دریافت می‌کردند، ٤) گروه کروسین، که ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر کروسین را دریافت می‌کردند، ۵) گروه زیتون تلخ -کروسین، که مخلوطی از زیتون تلخ (۱۰۰ ماکرولیتر عصاره خالص) و کروسین (۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) را دریافت می‌کردند. خوراندن تمامی موارد دارو درمانی به صورت خوراکی و مستقیم از راه دهان انجام گرفت.

کالبد گشایی موش‌ها: پس از ۱٤۰ روز درمان، موش‌ها با شرایط مرگ آرام و با استفاده از کتامین – اسپرومازین بیهوش شدند و خونگیری از قلب با سرنگ انسولین انجام شد. پس از کالبد گشایی ابتدا تعداد، اندازه و وزن کیست‌ها در هر گروه اندازه‌گیری شد. نمونه‌های خون گرفته شده از موش‌ها ابتدا سانتریفیوژ و سرم آنها جداسازی شد و سپس سنجش آنزیم‌های کبدی شامل، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، الانین ترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و بیلی روبین (BILI) با استفاده از کیت‌های مربوط به هر آنزیم از شرکت پارس آزمون و دستگاه mindray مدل BS-200E (china) انجام شد.

آنالیز آماری: نتایج حاصل از این مطالعه ابتدا در نرم-افزار Excel وارد شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. آنالیز واریانس و سپس میانگین داده‌ها براساس آزمون LSD انجام شد و اختلاف معنی‌دار آنها در سطح ۵ درصد اعلام گردید.

نتایج

نتایج اثر کشندگی زیتون تلخ بر پروتواسکولکس کیست هیداتید تحت شرایط برون‌تنی: میزان زنده مانی پروتواسکولکس‌ها تحت تاثیرغلظت‌های مختلف عصاره زیتون تلخ در ۱۵ و ٦۰ دقیقه بعد از تیمار و با رنگ‌آمیزی ائوزین ۰/۱ درصد زیر میکروسکوپ نوری تعیین شد. با توجه به جدول ۱ عصاره زیتون تلخ خالص بیشترین تاثیر کشندگی را بر روتواسکولکس‌های **کیست هیداتید** بعد از ٦۰ دقیقه در مقایسه با سایر غلظت‌های عصاره دارد؛ بنابراین این غلظت از عصاره زیتون تلخ برای درمان موش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج اثر زیتون تلخ و کروسین بر پروتواسکولکس کیست هیداتید تحت شرایط درون‌تنی: در این بررسی ابتدا تعداد ۳۰ سر موش سوری ماده به صورت تجربی به کیست هیداتید آلوده شدند و پس از یک هفته به ۵ گروه درمانی شامل شاهد، آلبندازول، زیتون تلخ، کروسین و زیتون تلخ -کروسین تقسیم شدند و سپس تحت درمان قرار گرفتند. پس از ۱۴۰ روز موش‌ها کالبد گشایی شدند و نتایج به دو صورت ماکروسکوپی و اندازه‌گیری فاکتورهای کبدی ارائه شد (جدول ۲).

نتایج ماکروسکوپی: مطابق با جدول ۲، تعداد کیست‌ها در گروه‌های تحت درمان به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که تعداد کیست‌های مشاهده شده در گروه‌های تیمار شده با زیتون تلخ و زیتون تلخ -کروسین به طور معنی‌داری کمتر از گروه آلبندازول می‌باشد ($p < ۰/۰۵$). مقایسه میانگین وزن کیست‌ها نیز نشان داد که در گروه‌های درمانی میانگین وزن کیست‌ها به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد می‌باشد و علاوه براین میانگین وزن کیست‌ها در گروه‌های تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه آلبندازول کاهش یافته است در حالیکه هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ -کروسین مشاهده نشد ($p < ۰/۰۵$). بررسی میانگین اندازه کیست‌ها نشان داد (جدول ۲) که تیمار با کروسین، زیتون تلخ و کروسین-زیتون تلخ، به طور مشابهی موجب کاهش قابل ملاحظه ی اندازه ی کیست‌ها در مقایسه با گروه شاهد و گروه تحت درمان با آلبندازول می‌گردد ($p < ۰/۰۵$).

بررسی فاکتورهای کبدی: مطابق با جدول ۲ اندازه‌گیری فاکتور کبدی ALT نشان داد که میزان این فاکتور در گروه‌های درمانی در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است. علاوه بر این، میزان ALT در گروه‌های تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین بطور معنی‌داری کمتر از گروه تحت درمان با آلبندازول می‌باشد ($p < ۰/۰۵$)، در حالیکه هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ -کروسین مشاهده نشد ($p < ۰/۰۵$). اندازه‌گیری فاکتور کبدی AST (جدول ۲) نشان داد که در گروه‌های تحت درمان میزان فعالیت آنزیم AST به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته است و علاوه بر این میزان این فاکتور در گروه‌های تحت درمان با زیتون تلخ و زیتون تلخ -کروسین به طور معنی‌داری کمتر از گروه تیمار شده با آلبندازول می‌باشد ($p <$ ۰/۰۵).

میزان فاکتور کبدی ALP (جدول ۲) در گروه‌های تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین در مقایسه با گروه تحت درمان با آلبندازول و شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است. اگرچه بین گروه‌های تحت درمان با زیتون تلخ و زیتون تلخ -کروسین اختلاف معنی‌داری در میزان این فاکتور مشاهده نشد ($p < ۰/۰۵$). اندازه‌گیری فاکتور کبدی BILI (جدول ۲) نشان داد که میزان این فاکتور در هر چهار گروه درمانی در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است و علاوه بر این بین این چهار گروه اختلاف معنی‌داری در میزان فاکتور کبدی مورد نظر مشاهده نشده است ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۱- میزان اثر کشندگی زیتون تلخ بر پروتواسکولکس کیست هیداتید

	غلظت عصاره			
	۱	۱:۱۰	۱:۱۰۰	۱:۱۰۰۰
درصد کشندگی بعد از ۱۵ دقیقه	٦۰٪	٤۰٪	۲۰٪	۱۰٪
درصد کشندگی بعد از ٦۰ دقیقه	۸۰٪	۵۰٪	۳۰٪	۱۵٪

جدول ۲- میانگین اثر بخشی آلبندازول، کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین بر تعداد، وزن و اندازه کیست و فاکتورهای کبدی در موش مبتلا به کیست هیداتید

	کنترل	البندازول	زیتون تلخ	کروسین	زیتون تلخ-کروسین
تعداد کیست	۵/٦٦٦ ± ۰/۳۳ ^{a}	۳/٦٦٦ ± ۰/۳۳ ^{a}	۱/۳۳۳ ± ۰/۳۳ ^{c}	۲/۳۳۳ ± ۰/۳۳ ^{bc}	۱/٦٦٦ ±۰/۳۳ ^{c}
وزن کیست (g)	۰/۹٤٦٦ ± ۰/۰٤۳^{a}	۰/٤۸۰ ± ۰/۰٤۳ ^{b}	۰/۱۱ ± ۰/۰٤۳ ^{c}	۰/۱۸ ± ۰/۰٤۳ ^{c}	۰/۱۵ ± ۰/۰٤۳ ^{c}
اندازه بزرگترین کیست (mm)	۱۱/٦ ± ۰/۸٤ ^{a}	۸/۰ ± ۰/۸٤ ^{a}	۳/٦٦ ± ۰/۸٤ ^{b}	٤/۰ ± ۰/۸٤ ^{b}	٤/۰ ± ۰/۸٤ ^{b}
آلانین ترنسفراز (U/L)	۲٦٤/٦ ± ۱۲/۵۲ ^{a}	۱۷۰ ± ۱۲/۵۲ ^{b}	۱۱۱ ± ۱۲/۵۲ ^{c}	۸٤/۳۳ ± ۱۲/۵۲ ^{c}	۸٤/۳۳ ±۱۲/۵۲ ^{c}
آسپارتات آمینوترنسفراز (U/L)	۵٦/۳۳ ± ۲/۰٦ ^{a}	٤۳/٦٦ ± ۲/۰٦ ^{b}	۳٦ ± ۲/۰٦ ^{bc}	۳۳/۳۳ ± ۲/۰٦ ^{c}	۳۳/۳۳ ± ۲/۰٦ ^{c}
آلکالین فسفاتاز (U/L)	٤۸/۳۳ ± ۱/٦۷ ^{a}	۳۹ ± ۱/٦۷ ^{b}	۱۹ ± ۱/٦۷ ^{d}	۲۸/٦ ± ۱/٦۷ ^{c}	۲۱/٦٦ ± ۱/٦۷^{cd}
بیلی‌روبین (U/L)	۰/۱۹٦ ± ۰/۰۱۸ ^{a}	۰/۰۹۹ ± ۰/۰۱۸^{b}	۰/۰۷۳ ±۰/۰۱۸ ^{b}	۰/۰۷۳ ± ۰/۰۱۸ ^{b}	۰/۰۸۳ ± ۰/۰۱۸

طبق آزمون LSD میانگین های دارای حرف مشترک اختلاف معنی داری با هم ندارند ($p < ۰/۰۵$).

بحث

کیست هیداتید یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است. انگل بالغ یکی از سستودهای روده باریک گوشتخواران است و نوزاد آن در اندام‌های مختلف پستانداران و انسان زندگی می‌کند و کیست هیداتید نامیده می‌شود. ابتلا به کیست هیداتید در انسان گاهی می‌تواند ضایعات شدید و غیر قابل جبرانی را در پی داشته باشد. در درمان دارویی ممکن است عوارض جانبی دارویی و مقاومت دارویی ایجاد شود. مطالعات نشان داده است که میوه درخت زیتون تلخ (*Melia azedarach*) دارای خواص ضد انگلی، ضد قارچی و ضد باکتریایی می‌باشد و علاوه بر این از گذشته در طب سنتی چین استفاده می‌شده است. گیاه زعفران دارای مصارف درمانی و غذایی بوده و منبع غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی از جمله فلاونوئیدها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها (ریبوفلاوین و تیامین)، آمینواسیدها، مینرال‌ها، صمغ‌ها و همچنین کاروتنوئیدهایی مثل کروسین، پیروکسین و سافرانال می‌باشد. با توجه به خواص زیتون تلخ و کروسین و اهمیت یافتن داروهای گیاهی با عوارض جانبی کمتر و اثرات درمانی بهتر بر روی کیست هیداتید، در مطالعه حاضر، اثر درمانی عصاره دانه گیاه زیتون تلخ و کروسین با منشا زعفران که بطور تجاری تهیه شد بر روی مدل موش آلوده به کیست هیداتید در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اثر غلظت‌های مختلف زیتون تلخ بر پروتواسکولکس کیست هیداتید تحت شرایط برون‌تنی نشان داد که عصاره زیتون تلخ خالص بیشترین اثر کشندگی (۸۰ درصد) را بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید بعد از ٦۰ دقیقه تیمار در مقایسه با سایر غلظت‌های عصاره دارد. نتایج آزمایشات درون‌تنی نیز نشان داد که در گروهای تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین، تعداد، وزن و اندازه کیست‌های هیداتید در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است. نتایج مطالعه حاضر با

نتایج مطالعات موذنی و همکاران (۱۲) هم‌خوانی دارد. موذنی و همکاران نشان دادند که تعداد، اندازه و وزن کیست‌ها در موش‌های تحت درمان با عصاره متانولی آویشن شیرازی بطور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد (۱۲).

Liu و همکاران (۱۰) نیز اثرات ضد انگلی کروسین را بر روی متاسستودهای *E. multilocularis*، سلول‌های ژرمینال و پروتواسکولس‌ها در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند و به علاوه در ارزیابی درون‌تنی نیز مشخص شد که ٦٠ درصد پروتواسکولکس‌ها با تیمار کروسین (۱۰ میکرومولار) به مدت ۷ روز کشته می‌شوند و وزن متاسستودها پس از تجویز کروسین به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. نتایج ما با این مطالعات هم‌خوانی دارد. علاوه براین، بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی کبدی نیز بیشترین اثر کشندگی کیست هیداتید را درگروه‌های تحت درمان با زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین در مقایسه با گروه تحت درمان با داروی ضد انگل آلبندازول و شاهد نشان داد. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات محقیقن دیگر هم-خوانی دارد (۱، ۹، ۲۳، ۲۵).

عبدالغنی و همکاران (۱) در پژوهش خود فعالیت کنه‌کشی نانوامولسیون دارای روغن *Artemisia herba-alba* و زیتون تلخ را در برابر کنه *Hyalomma dromedarii* نشان دادند و علاوه بر این اثر این ترکیبات را در کاهش فعالیت آنزیم ALT و ALP بر روی موش‌های آلبینو سوئیسی نشان دادند. حاجی آخوندی و همکاران نیز نشان دادند که روغن دانه زیتون تلخ قادر به کشتن لارو پشه آنوفل استفنسی می‌باشد (۵).

سریع السیری و همکاران (۲۳) نیز گزارش کردند که روغن دانه این درخت با غلظت ۵ درصد اثرات کشندگی روی مایت درمانیسوس گالینه در شرایط آزمایشگاهی دارد. همچنین تاثیر روغن زیتون تلخ روی کنه بوفیلوس میکروپلوس توسط سویوسا و همکاران نشان داده شد (۲۵). خوش رفتار و همکاران (۹) در مطالعه خود برای اولین بار فعالیت حشره‌کشی عصاره‌های برگ نانوکپسوله‌شده گیاه زیتون تلخ ایرانی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره گیاه زیتون تلخ (نانولیپوزوم های بدون پوشش و نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار) برای حشره T. vaporariorum سمی‌تر است. علاوه بر این درصد مرگ و میر حشره توسط عصاره خالص گیاهی و عصاره گیاهی بارگذاری شده در نانولیپوزوم‌ها به ترتیب ۱۳ و ۸۳ درصد به دست آمد. در تطابق با این مطالعات در تحقیق حاضر نیز عصاره گیاه زیتون تلخ و کروسین نیز باعث مرگ ۸۰ درصد از پروتواسکولکس کیست هیداتید و کاهش معنی‌داری تعداد، وزن و اندازه کیست‌های هیداتید در مقایسه با شاهد شدند.

مطالعات دیگری نیز اثرات ضد انگلی دو گیاه زیتون تلخ (۱۸) و کروسین (۲۱) را بر روی سایر انگل‌ها نشان دادند به عنوان مثال اثر درمانی زیتون تلخ روی تنیا سولیوم (سستودها) و کرم‌های خاکی آنیلیدا نشان داده شده است (۲٦). همچنین اثر درمانی زیتون تلخ روی پارمفیستوموم سروی به اثبات رسیده است (۱٦). در مطالعه‌ی اثرات ضد لیشمانیایی کروسین بر علیه لیشمانیا ماژور مورد بررسی قرار گرفته است (۲۵). همچنین اثرات حشره‌کشی کروسین نیز به اثبات رسیده است (۲، ۳، ۱۹).

این مطالعات با نتایج ما هم‌خوانی دارد. اثرات ضد انگلی قابل توجه گیاه زیتون تلخ را می‌توان به ترکیبات موجود در این گیاهان نسبت داد. برخی از ترکیبات موجود در زیتون تلخ در سیستم گوارشی انگل تداخل ایجاد می‌کنند و باعث مرگ انگل می‌شوند (۱۰).

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر اثر درمانی عصاره دانه زیتون تلخ و کروسین بر روی کیست هیداتید تحت شرایط برون‌تنی و درون‌تنی بررسی گردید. در بررسی برون‌تنی اثر درمانی عصاره گیاه زیتون تلخ و کروسین بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید با استفاده از روش ائوزین مشخص شد که عصاره خالص این گیاه پس از ۱۵ دقیقه ۶۰ درصد و پس از ۶۰ دقیقه ۸۰ درصد اثر کشندگی بر روی پروتواسکولکس‌ها دارد. همچنین در مطالعات حیوانی اثر زیتون تلخ و کروسین بر موش‌های به طور تجربی الوده به کیست هیداتید نیز مشخص شد که در سه گروه تحت درمان با کروسین، زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین، تعداد، وزن و اندازه کیست‌های هیداتید در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است. علاوه براین، بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی کبدی ALT، AST، ALP و BILI نشان داد که میزان این فاکتور در گروه‌های تحت درمان با زیتون تلخ و کرسین و مخلوطی از دو هر دو ترکیب به طور معنی‌داری کاهش یافته است. نتایج بیشترین اثر کشندگی کیست هیداتید را در گروه‌های تحت درمان با زیتون تلخ و زیتون تلخ-کروسین در مقایسه با سایرگروها نشان داد. در مجموع مطالعه حاضر، اثر پروتواسکولکس-کشی عصاره دانه زیتون تلخ و کروسین را بر کسیت هیداتید تحت شرایط برون‌تنی و درون‌تنی نشان داد.

منابع

1. Abdel-Ghany H.S.M., Abdel-Shafy S., Abuowarda M., El-Khateeb R.M., Hoballah E.M., Fahmy M.M. 2021. Acaricidal activity of Artemisia herba-alba and Melia azedarach oil nanoemulsion against Hyalomma dromedarii and their toxicity on Swiss albino mice. *Experimental and Applied Acarology*, 84(1):241-262.

2. Al-Snafi A.E. 2016. The pharmacology of Crocus sativus-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(6):8-38.

3. Balarastaghi S., Yazdian-Robati R., Vahdati Hasani F., Hosseinzadeh H., Abnous K., Imenshahidi M., Razavi B.M. 2021. Protective Effect of Crocin on Malathion-induced Cardiotoxicity in Rats: A Biochemical, Histopathological and Proteomics Study. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(2):156-172.

4. Gholami S., Rahimi-Esboei B., Ebrahimzadeh, M., Pourhajibagher M. 2013. In vitro effect of Sambucus ebulus on scolices of Hydatid cysts. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(13):1760-1765.

5. Hadjiakhoondi A., Vatandoost H., Khanavi M., Sadeghipour Roodsari H.R., Vosoughi M., Kazemi M., Abai M.R. 2006. Fatty Acid Composition and Toxicity of Melia azedarach L. Fruits against Malaria Vector Anopheles stephensi. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2): 97-102.

6. Haji Mohammadi K.H., Heidarpour M., & Borji H. 2019. Allium Sativum Methanolic extract (garlic) improve therapeutic efficacy of albendazole against hydatid cyst: In vivo study. J*ournal of Investigative Surgery*, 32(8):723-730.

7. Hussain R., Ihsan A., Shah A.A., Ullah N., Iftikhar H., Jalal R. 2022. Ecofriendly management of green pea (*Pisum sativum* L.) insect pests through plant extracts. *Sarhad Journal of Agriculture*, 38(4):1405-1411.

8. Hosseinzadeh H., Sadeghnia H.R., Ziaee, T., Danaee A. 2005. Protective effect of aqueous saffron extract (Crocus sativus L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(3):387-393.

9. Khoshraftar Z., Safekordi A.A., Shamel A., Zaefizadeh M. 2020. Evaluation of insecticidal activity of nanoformulation of

Melia azedarach (leaf) extract as a safe environmental insecticide. International journal of environmental science and technology, 17(23):1159-1170.

10. Liu C., Fan H., Guan L., Ge R.L., Ma L. 2021. In vivo and in vitro efficacy of crocin against Echinococcus multilocularis. *Parasites and Vectors*, 14(1):1-17.

11. Mishra G., Jawla S., & Srivastava V. 2013. Melia azedarach: a review. *International Journal of Medicinal Chemistry and Analysis*, 3(2):53-56.

12. Moazeni M., Larki S., Saharkhiz M.J., Oryan A., Ansary Lari M., Mootabi Alavi A. 2014. In vivo study of the efficacy of the aromatic water of Zataria multiflora on hydatid cysts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10):6003-6008.

13. Moazeni M., Nazer A. 2010. In vitro effectiveness of garlic (Allium sativum) extract on scolices of hydatid cyst. *World Journal of Surgery*, 34(11):2677-2681.

14. Moazeni M., Saharkhiz M.J., Hosseini A.A. 2012. In vitro lethal effect of ajowan (Trachyspermum ammi L.) essential oil on hydatid cyst protoscoleces. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2):203-208.

15. Mordue A.J., Nisbet A.J. 2000. Azadirachtin from the neem tree Azadirachta indica: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29:615-632.

16. Neogi N., Baliga, P., Srivastava R. 1963. In vitro Anthelmintic Activity of some Indigenous Drugs. *Journal of the Indian Medical Association*, 41(9):435-437.

17. Ntalli N.G., Cottiglia F., Bueno C.A., Alche L.E., Leonti M., Vargiu S., Caboni P. 2010. Cytotoxic Tirucallane Triterpenoids from Melia azedarach Fruits. *Molecules*, 15(9):5866-5877.

18. Omar M.K., Muhammad H.A., Mirkhan S.M. 2023. Effects of Crude Plant Extracts from Five Parts of Melia azedarach on Tribolium confusum. A*ro-the Scientific Journal of Koya University*, 11(1):48-51.

19. Peng Y., Gu T., Zhong T., Xiao,Y., Sun Q. 2022. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders: Opposite Roles of Phytochemicals and Food Contaminants. *Current Opinion in Food Science*, 48: 100913.

20. Priyadarsini R.V., Murugan R.S., Sripriya P., Karunagaran D., Nagini S. 2010. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide induce cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells. *Free Radical Research*, 44(6):624-634.

21. Ranjbar R., Shayanfar P., Maniati M. 2021. In Vitro Antileishmanial Effects of Saffron Compounds, Crocin and Stigmasterol, on Iranian Strain of Leishmania major (MHOM/IR/75/ER). *Iranian Journal of Parasitology*, 16(1):151.

22. Sariosseiri A., Moshaverinia A., Khodaparast M.H.H., Kalidari G.A. 2018. In vitro acaricidal effect of Melia azedarach ripe fruit extract against Dermanyssus gallinae (Acari: Dermanyssidae). *Persian Journal of Acarology*, 7(2):455.

23. Sayek I., Tirnaksiz M.B., & Dogan R. 2004. Cystic Hydatid Disease: Current Trends in Diagnosis and Management. *Surgury Today*, 34(12):987-996.

24. Sharma D., Paul Y. 2013. Preliminary and pharmacological profile of Melia azedarach L.: An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(12):133-138.

25. Sousa L.A.D.d., Rocha T.L., Sabóia-Morais S.M.T., Borges L.M.F. 2013. Ovary histology and quantification of hemolymph proteins of Rhipicephalus (Boophilus) microplus treated with *Melia azedarach*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(3):339-345.

26. Szewezuk V., Mongelli E.R., & Pomilio A.B. 2003. Antiparasitic activity of Melia azadirach growing in Argentina. *Molecular*

Medicine and Chemistry, 1:54-57.

27. Thompson R.C.A. 2008. The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. *Experimental Parasitology*, 119(4): 439-446.

28. Walker M., Rossignol J.F., Torgerson P., & Hemphill A. 2004. In vitro effects of nitazoxanide on Echinococcus granulosus protoscoleces and metacestodes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(3):609-616.

The Effect of Bitter Olive Plant Extract (*Melia azedarach*) and Crocin on Mice with Hydatid Cyst

Raheleh Rahbarian[1*], S. Shahrbanoo Jafari[2], Hamid Eshrati[1]

1. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Hydatid cyst is one of the most important common diseases between humans and animals. In the present study, the therapeutic effect of Melia azedarach seed extract and Crocin on a mouse model infected with hydatid cysts was investigated in vitro and in vivo conditions. In vitro study 0.1% eosin staining method was used. In vivo study, 30 female laboratory mice were infected with hydatid cysts by intraperitoneal injection of 0.5 ml of liquid containing 2000 protoscolex. One week after the injection, the mice were randomly divided into 5 treatment groups of 6 in separate cages. These groups include 1- control group (without any type of treatment), 2- Albendazole group (Albendazole dose 75 mg/kg), 3- Melia azedarach group (100 microliter Melia azedarach extract), 4- Crocin group (100 mg/ml crocin), 5- Melia azedarach - Crocin group (a mixture of Melia azedarach extract and Crocin). 140 days after the treatment, the desired tests were performed. In vitro investigation of the lethal effect of the pure Melia azedarach extract on protoscolexes showed that after 15 and 60 minutes of incubation, 60 and 80% of protoscolexes are destroyed, respectively. The results of in vivo tests also showed that in the groups treated with Crocin, Melia azedarach, and Melia azedarach-Crocin, the number, weight, and size of hydatid cysts were significantly reduced compared to the control. In addition, the examination of liver biochemical factors showed the most significant lethal effect of hydatid cyst in the groups treated with Melia azedarach and Melia azedarach-Crocin compared to the group treated with the anti-parasitic drug Albendazole and control.

Keywords: Hydatid cyst, Melia azedarach, Crocin, Biochemical factors.