

The Effect of Albendazole and Mebendazole on the Viability of Hydatid Cyst Protoscoleces in Vitro

Seyed Jafar Adnani Sadati^{1*}, Ali Farahnak², Mohammad Bagher Molaeirad², Shahram Arsangjang³

¹Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

²Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Public Health & Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³Department of Epidemiology & Biostatistics, Faculty of Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

***Corresponding Author:**
Seyed Jafar Adnani Sadati,
Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Email:
Jafaradnani@yahoo.com

Received: 19 Jun, 2016

Accepted: 9 Oct, 2016

Abstract

Background and Objectives: Hydatidosis is caused by larval stage of the cestoda *Echinococcus granulosus* in humans and domestic animals. Many protoscolicidal agents have been used to treat it. The purpose of this study was to investigate the effect of albendazole and mebendazole on the viability of protoscoleces in vitro.

Methods: In this experimental study, after collection of hydatid cyst livers, protoscoleces were aseptically removed and their viability was examined; then, certain volume of protoscoleces was poured into culture medium (RPMI-1640/PBS, pH 7.2) and albendazole and mebendazole solution with final concentration of 1 µg/ml, was added to them. After a certain time interval, in order to determine the significant statistical difference between protoscoleces viability, one-way ANOVA (with bootstrap method) and Tukey post-hoc tests (for comparing two culture media RPMI and PBS), were used.

Results: In this study, albendazole was more effective in removing protoscoleces. In the group in which albendazole were used, the viability percentage of protoscoleces reached zero after 35 days, while the viability of protoscoleces in the mebendazole group reached zero after more than 42 days ($p < 0.05$).

Conclusion: The obtained results of this research showed the favorable effect of albendazole on protoscoleces, therefore, it is likely that albendazole can be used as an appropriate drug for elimination of hydatid cyst protoscoleces and for prevention of the relapse of this disease.

Keywords: Echinococcosis, Hepatic; Protoscoleces; Albendazole; Mebendazole; Culture media.

اثر داروی آلبندازول و مبندازول بر میزان بقای پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک در شرایط *in vitro*

سیدجعفر عدنانی ساداتی^{۱*}، علی فرهناک^۲، محمدباقر مولایی راد^۳، شهرام ارسنگ جنگ^۳

چکیده

زمینه و هدف: بیماری هیداتیدوزیس توسط مرحله لاروی سستود/کینوکوکوس گرانولوزوس در انسان و حیوانات اهلی ایجاد می‌شود. بسیاری از عوامل پروتواسکولوسیدال برای درمان آن استفاده شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر آلبندازول و مبندازول بر زنده ماندن پروتواسکولکس‌ها در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پس از جمع‌آوری کبدهای آلوده به کیست هیداتیک، پروتواسکولکس‌ها در شرایط استریل، از کیست تخلیه و میزان زنده بودن آنها مورد بررسی قرار گرفت، سپس حجم معینی از پروتواسکولکس‌ها در محیط کشت (۱۶۴۰ RPMI، PBS، pH برابر ۷/۲) ریخته شدند و محلول آلبندازول و مبندازول با غلظت نهایی ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به آنها اضافه گردید. پس از بازده زمانی خاص، به‌منظور تعیین تفاوت آماری معنی‌دار بین زنده‌ماندن پروتواسکولکس‌ها، از آزمون‌های واریانس یک‌طرفه (با روش بوت استرپ) و تعقیبی توکی (برای مقایسه دو محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI و PBS) استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، آلبندازول در از بین بردن پروتواسکولکس‌ها مؤثرتر بود. در گروهی که در آن آلبندازول مورد استفاده قرار گرفت، مقدار درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها بعد از ۳۵ روز به صفر رسید، درحالی‌که زنده بودن پروتواسکولکس‌ها در گروه مبندازول، بیش از ۴۲ روز به‌طول انجامید ($p \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش، اثر مطلوب آلبندازول بر پروتواسکولکس‌ها را نشان داد، لذا احتمال می‌رود بتوان از آلبندازول به‌عنوان یک داروی مناسب در از بین بردن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک و برای پیشگیری از عود این بیماری استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: کینوکوکوس؛ کیست هیداتیک؛ پروتواسکولکس؛ آلبندازول؛ مبندازول؛ محیط کشت.

^۱گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

^۲گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۳گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

سیدجعفر عدنانی ساداتی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

jafaradnani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Adnani Sadati SJ, Farahnak A, Molaei Rad MB, Arsangjang Sh. The effect of albendazole and mebendazole on the viability of hydatid cyst protoscolec in vitro. Qom Univ Med Sci J 2017;11(4):10-19. [Full Text in Persian]

مقدمه

بیماری کیست هیداتیک (CHD)، یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که عامل آن مرحله لاروی (متاسستود) کرم نواری *اکیونوکوکوس گرانولوزوس* می باشد (۱). در چرخه زندگی این انگل، سگ میزبان اصلی و میزبان واسطه؛ نشخوارکنندگان، به خصوص گوسفند، گاو و شتر می باشد. درحالی که انسان می تواند به عنوان میزبان واسطه تصادفی عمل کند (۲). راه اصلی عفونت انسان به این بیماری، ورود تخم انگل از طریق دهان توسط دست و سبزیهای آلوده است (۳). نوزاد انکوسفر در روده کوچک آزاد شده و با عبور از مخاط، از طریق گردش خون وریدی باعث عفونت در بافت های مختلف، از جمله کبد و ریه می شود (۴). این بیماری از انتشار گسترده جهانی برخوردار بوده و از اکثر مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا، به ویژه کشورهایی که دامپروری در آنها رایج است، گزارش شده است. ایران یکی از کانون های اندمیک *اکیونوکوکوس* به شمار می رود. براساس مطالعات دلیمی و همکاران در ۵ استان غربی ایران (طی سالهای ۱۳۷۶-۱۳۷۹) در منطقه شمال، میزان عفونت مشابهی (۲۲٪ و ۲۲/۳٪) در سگ های ولگرد و شغال زرد با *اکیونوکوکوس گرانولوزوس* گزارش شده است (۵).

در مطالعات انجام شده داخلی نیز میزان آلودگی از شهرهایی مانند همدان (۳٪)، کرج (۰/۵٪)، عشایر فارس (۵٪) و ورامین (۹/۷٪) گزارش شده است. در بررسی ظریف فرد و همکاران، میزان آلودگی در غرب کشور (اردبیل، آذربایجان غربی و شرقی، ایلام، کردستان، همدان و لرستان) ۵/۵۵٪ بوده است (۶، ۷). این بیماری، آسیب قابل توجهی را به هر دو میزبان واسطه (انسان، به عنوان میزبان اتفاقی و دام ها، به عنوان میزبان طبیعی) وارد کرده و هر ساله هزاران انسان در معرض عوارض جدی و خطرناک؛ حتی مرگ ناشی از این بیماری قرار می گیرند (۸).

در درمان کیست هیداتیک همراه با عمل جراحی، از سال ۱۹۷۷ از برخی داروها مانند آلبندازول و مبندازول (از خانواده بنزیمیدازول)، به عنوان داروهای انتخابی استفاده شده است. امروزه، داروی آلبندازول برای درمان بیماری هیداتیک، انتخابی است (۹). آلبندازول پس از جذب در روده به سرعت در کبد متابولیزه می شود.

این ماده از دیواره کیست عبور می کند و می توان آن را در مایع کیست ردیابی کرد. اگر کیست هیداتیک در قسمتی از بدن تشکیل شود و امکان درمان جراحی نباشد برای جلوگیری از تشکیل کیست های ثانویه، از آلبندازول به عنوان یک داروی پیشگیری کننده استفاده می شود (۱۰). با توجه به مشکلات بهداشتی، اجتماعی و اقتصادی لازم است تحقیقات وسیع در زمینه های مختلف بیماری صورت گیرد که اکثر این مطالعات نیاز به محیط های مناسب آزمایشگاهی دارد تا بتوان تحقیقات را ابتدا در محیط های آزمایشگاهی مناسب انجام داد و سپس نتایج آن را تعمیم و گسترش داد.

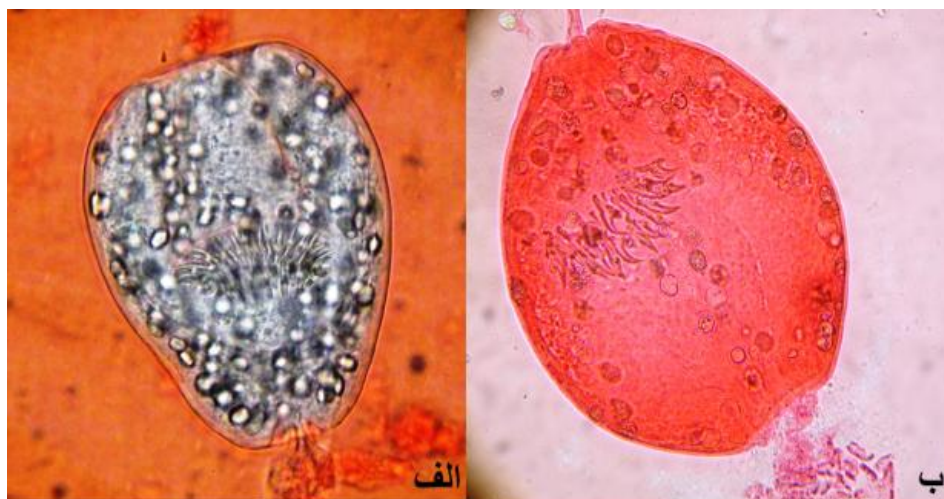
بنابراین، جهت بررسی اثربخشی داروی آلبندازول و مبندازول علیه پروتواسکولکس های کیست هیداتیک به طور جداگانه، در این مطالعه تست میزان بقای پروتواسکولکس ها در شرایط آزمایشگاهی (محیط کشت ۱۶۴۰ PBS/RPMI) انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، کبدهای آلوده به کیست هیداتیک از گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه نیمه صنعتی سلمانیه از توابع شهر ری با همکاری مسئول فنی (دامپزشک) کشتارگاه، شناسایی و جداسازی شدند و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال یافتند. ابتدا بافت کبد آلوده زیر هود در شرایط کاملاً ایمن و استریل قرار داده شد و با استفاده از پنبه الک (۷۰٪)، سطح رویی کیست ها استریل گردید، سپس مایع داخل کیست با استفاده از سرنگ آسپیره شد. کل مایع هر کیست که حاوی تعداد زیادی پروتواسکولکس بود در فالكون جداگانه جمع آوری شد. برای به دست آوردن تعداد نسبی پروتواسکولکس ها، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از مایع کیست را روی لام قرار داده و زیر لوپ، تعداد پروتواسکولکس ها شمارش شد، سپس با توجه به حجم کل مایع کیست، تعداد نسبی پروتواسکولکس ها در هر کیست محاسبه گردید. در ادامه، پروتواسکولکس ها چندین بار با بافر فسفات شسته شدند و میزان زنده بودن پروتواسکولکس ها (با توجه به حرکت سلول های شعله ای و رنگ آمیزی با اتوزین ۰/۱٪) زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، پروتواسکولکس هایی که

خریداری و در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با دی متیل سولفوکساید ۱٪ (DMSO) (Merck, Germany) آماده‌سازی شد (۱۱، ۱۲).

بیش از ۹۸٪ آنها زنده بود، جهت بررسی اثر دارو انتخاب شدند (شکل شماره ۱). داروی البندازول از شرکت رز دارو و مبندازول از شرکت تولید داروهای دامی در ایران به صورت خالص،



شکل شماره ۱: رنگ آمیزی پروتواسکولکس‌ها با رنگ انوزین.
(الف) پروتواسکولکس‌های زنده؛ (ب) پروتواسکولکس‌های مرده.

گروه D نیز به عنوان گروه کنترل (بدون دارو و دی متیل سولفوکساید) در نظر گرفته شد. جهت بررسی اثر دو دارو بر روی انگل، هر ۱۲ ساعت با استفاده از سمپلر، مقدار ۱۰ میکرولیتر انگل بر روی لام قرار داده شد و به همان اندازه، رنگ انوزین ۱٪/۰۱ اضافه گردید. سپس لام را روی لام گذاشته و بعد از چند دقیقه زیر میکروسکوپ، میزان زنده بودن پروتواسکولکس‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). پروتواسکولکس‌هایی که رنگ انوزین را به خود گرفته بودند، مرده و پروتواسکولکس‌های بدون رنگ، زنده در نظر گرفته شدند. تعداد پروتواسکولکس‌ها با شمارش، به صورت درصد یادداشت گردید. این کار روزانه تا زمانی که درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها در همه محیط‌های کشت به صفر برسد انجام گرفت.

به منظور تعیین تفاوت آماری معنی‌دار بین زنده ماندن پروتواسکولکس‌ها در گروه درمان (آلبندازول و مبندازول) و کنترل، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و از آزمون واریانس یک‌طرفه با روش بوت استرپ و آزمون تعقیبی توکی (برای مقایسه دو محیط کشت RPMI۱۶۴۰ و PBS) استفاده گردید.

برای کشت پروتواسکولکس‌ها، از محیط کشت RPMI۱۶۴۰ (Gibco, CET. No:K۴۱۱۱-۵۰۰) و PBS استریل (pH برابر ۷/۲) با افزودن پنی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, CET. No:۱۵۱۴۰۱۲۲)، استفاده گردید.

در ادامه، برای کشت بدین ترتیب عمل شد:

ابتدا به طور جداگانه در فالكون‌های کشت، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI۱۶۴۰ و PBS به همراه ۵۰۰ میکرولیتر پروتواسکولکس‌های زنده و فعال (تقریباً در هر محیط ۱۴۰۰۰-۱۲۰۰۰ هزار پروتواسکولکس) ریخته شد و به هر محیط، داروی آلبندازول و مبندازول (با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید، سپس محیط‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO₂ نگهداری شدند (۱۳، ۱۴).

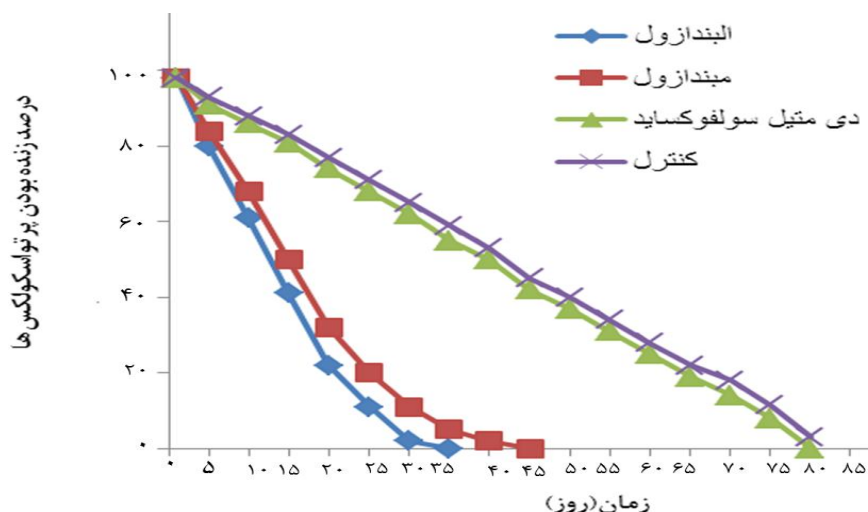
برای هر دو محیط کشت، پروتواسکولکس‌ها در ۴ گروه ۵ تایی A, B, C, D قرار گرفتند (۴ گروه ۵ تایی برای محیط کشت RPMI۱۶۴۰ و ۴ گروه ۵ تایی برای محیط کشت PBS). محیط‌های کشت A و B در هر محیط کشت به ترتیب شامل: گروه‌های تحت درمان با آلبندازول و مبندازول، همچنین فلاسک کشت C حاوی پروتواسکولکس همراه با محیط کشت و ۶۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید بود.

یافته‌ها

RPMI ۱۶۴۰ بر روی زنده ماندن پروتواسکولکس ها در نمودار

شماره ۱ نشان داده شده است.

نتایج بررسی اثر داروی آلبندازول و مبندازول در محیط



نمودار شماره ۱: اثر داروی آلبندازول و مبندازول بر روی بقای پروتواسکولکس ها در محیط RPMI ۱۶۴۰

($p \geq 0.0001$). مقایسه میانگین زنده بودن انگل‌ها در اثر داروی آلبندازول و مبندازول در محیط PBS با گروه کنترل، اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد ($p \geq 0.0001$). تعداد پروتواسکولکس‌های تحت درمان با داروی آلبندازول در طی مدت ۲۷ روز و پروتواسکولکس‌های تحت درمان با داروی مبندازول در طی مدت ۳۲ روز به صفر رسید. نتایج حاصل از مقایسه دو گروه کنترل و DMSO نیز در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری به دست نیامد (جدول شماره ۱).

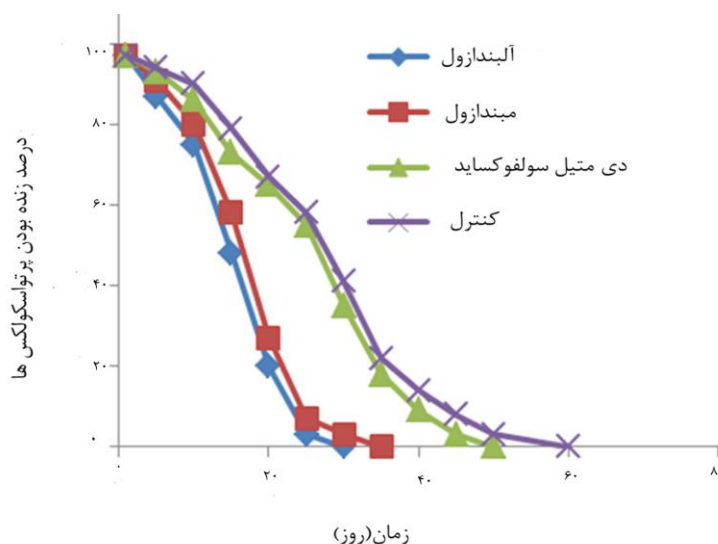
مقایسه میانگین زنده بودن انگل‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه در بین گروه‌های تحت درمان با داروی آلبندازول و مبندازول با گروه کنترل، اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد ($p \geq 0.0001$). در گروه آلبندازول، بعد از ۳۵ روز، درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها به صفر رسید، در حالی که در گروه مبندازول، ۴۵ روز طول کشید تا میزان درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها به صفر برسد و سرانجام در گروه C (DMSO) و گروه D (کنترل) بیش از ۸۰ روز طول کشید تا میزان درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها به صفر برسد که اختلاف آماری معنی‌داری در بین این دو گروه مشاهده نشد.

جدول شماره ۱: نتایج توصیفی انگل‌های زنده مانده پروتواسکولکس ها در محیط کشت، بر حسب نوع محیط کشت

تعداد	RPMI			PBS			گروه
	میانگین $\pm$ انحراف معیار	می نیمم	ماکزیمم	میانگین $\pm$ انحراف معیار	می نیمم	ماکزیمم	
۵	۱۱۹/۲ $\pm$ ۱۸/۴۸۵	۱۰۳	۱۵۰	۱۰۷/۶ $\pm$ ۲۵/۵۴	۸۱	۱۴۸	کنترل
۵	۰/۰۴ $\pm$ ۰/۵۴۷	۰/۰۰	۱	۰/۰ $\pm$ ۰/۰	۰/۰۰	۰/۰۰	آلبندازول
۵	۳۷/۲ $\pm$ ۸/۶۱۳	۲۹	۴۷	۶۳/۸ $\pm$ ۱۱/۵۴	۲۳	۵۴	مبندازول
۵	۱۱۸ $\pm$ ۱۴/۲۱۲	۱۰۲	۱۴۰	۱۰۹ $\pm$ ۳۶/۱۹	۷۰	۱۵۱	حلال دارو
۲۰	۶۸/۷ $\pm$ ۵۴/۱۲۵	۰/۰۰	۱۵۰	۶۳/۸ $\pm$ ۵۲/۱۷	۰/۰۰	۱۵۱	کل

* ۵ محیط کشت (۱-۵) که تحت درمان با دارو قرار گرفت.

نتایج بررسی اثر داروی آلبندازول و مبندازول در محیط PBS بر روی زنده ماندن پروتواسکولکس ها در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲: اثر داروی آلبندازول و مبندازول بر روی بقای پروتواسکولکس ها در محیط PBS.

براساس نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (با روش بوت استرپ و آزمون تعقیبی توکی)، بین میانگین تعداد انگل های زنده مانده در تمام گروه ها، بجز گروه کنترل با حلال دارو، همچنین آلبندازول با مبندازول، در محیط کشت PBS از نظر آماری معنی دار بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه برای مقایسه میانگین تعداد انگل های زنده مانده پروتواسکولکس ها

محیط کشت	گروه I	گروه II	اختلاف میانگین (I-II)	pvalue	کوان پایین	کوان بالا	فاصله اطمینان ۹۵٪
RPMI	کنترل	آلبندازول	$^{*}118/8$	۰/۰۰۰	۹۶/۳۰۵۰	۱۴۱/۲۹۵۰	
		مبندازول	$^{*}82$	۰/۰۰۰	۵۹/۵۰۵۰	۱۰۴/۴۹۵۰	
		حلال دارو	۱/۲	۰/۹۹۹	-۲۱/۲۹۵۰	۳۳/۶۹۵۰	
	آلبندازول	مبندازول	$^{*}36/8$	۰/۰۰۱	-۵۹/۲۹۵۰	-۱۴/۳۰۵۰	
		حلال دارو	$^{*}117/6$	۰/۰۰۰	-۱۴۰/۴۹۵۰	-۹۵/۱۰۵۰	
	مبندازول	حلال دارو	$^{*}8/8$	۰/۰۰۰	-۱۳۰/۲۹۵۰	-۹۸/۳۰۵۰	
PBS	کنترل	آلبندازول	$^{*}107/6$	۰/۰۰۰	۶۶/۱۸۳۳	۱۴۹/۰۱۶۷	
		مبندازول	$^{*}69$	۰/۰۰۱	۲۷/۵۸۳۳	۱۱۰/۴۱۶۷	
		حلال دارو	-۱/۴	۱/۰۰۰	۴۲/۸۱۶۷	۱۴۰/۱۶۷	
	آلبندازول	مبندازول	-۳۸/۶	۰/۰۷۲	-۸۰/۰۱۶۷	۲/۸۱۶۷	
		حلال دارو	$^{*}109$	۰/۰۰۰	-۱۵۰/۴۱۶۷	-۶۷/۵۸۳۳	
	مبندازول	حلال دارو	$^{*}70/4$	۰/۰۰۱	-۱۱۱/۸۱۶۷	-۲۸/۹۸۳۳	

بحث

از چند دهه پیش، مطالعات گسترده‌ای در درمان کیست هیداتیک انجام شده است. تا سال ۱۹۶۱ و کشف بنزیمیدازول‌ها، تنها راه درمان این بیماری عمل جراحی بود، اما بسیاری از بیمارانی که به هر دلیلی نمی‌توانستند تحت عمل جراحی قرار گیرند، به عوارض بیماری؛ حتی مرگ محکوم می‌شدند. با کشف بنزیمیدازول‌ها، مطالعات گسترده در درمان پزشکی کیست هیداتیک انجام شد (۱۰).

مبندازول، اولین دارویی بود که در این بیماری مورد استفاده قرار گرفت، اما به دلیل عوارض جانبی و استفاده طولانی‌مدت، این دارو با آلبندازول جایگزین گردید. درمان کیست‌های هیداتیک با استفاده از محلول‌های که باعث مرگ پروتواسکولکس‌ها می‌شود، لازم است. اسکولوسیدال‌ها نه تنها باید سریع تمام پروتواسکولکس را از بین ببرد؛ بلکه باید اثرات جانبی چندانی هم نداشته باشد (۱۸-۱۶).

در درمان کیست هیداتیک، دوز مؤثر آلبندازول، ۱۵-۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز به صورت خوراکی، حدود ۸۰٪ مؤثر است، اما به دلیل عوارض جانبی آن، به طور متناوب استفاده نمی‌شود (۱۹). جذب آلبندازول در انسان بهتر از مبندازول صورت می‌گیرد و بعد از جذب به متابولیت سولفوکسید آلبندازول که در درمان مؤثرتر بوده تبدیل می‌گردد. سطح سرمی آلبندازول نیز ۱۰ برابر بیشتر از مبندازول در دوز تجویز می‌شود (۲۰، ۱۶). در استفاده از داروی آلبندازول با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم جهت درمان، مقدار آن در پلاسما به سطح ۳۲۰۰۰ - ۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر و مقدار سطح سرمی به ۳۱۵ نانوگرم بر میلی لیتر و در مایع کیست هیداتیک به ۹۲۰-۸۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر می‌رسد. در مایع کیست هیداتیک، دوز بالای ۸۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر می‌تواند تمام پروتواسکولکس را از بین ببرد (۱۸). نتایج نشان داد حدوداً مدت ۳۰ روز برای کشتن پروتواسکولکس از آغاز درمان با آلبندازول لازم است؛ درحالی که جهت درمان با مبندازول، ۴۵ روز زمان لازم است. در مطالعه Morris و همکاران، اثرات داروی آلبندازول و مبندازول بر روی زنده ماندن پروتواسکولکس /کینوکوکوس گرانولوزوس در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت

که در نتیجه زنده ماندن پروتواسکولکس در محیط‌های کشت تحت درمان با آلبندازول (در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم برلیتر)، کاهش قابل توجهی را نشان داد و در طی ۴۱-۳۵ روز، میزان زنده بودن پروتواسکولکس‌ها به صفر رسید، اما در غلظت‌های پایین تر، بی‌اثر بود، درحالی که در محیط‌های کشت تحت درمان با مبندازول، بیش از ۴۵ روز طول کشید (۲۱).

در مطالعه Chinnery و همکاران، پروتواسکولکس‌ها در محیط کشت در غلظت نهایی ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم برلیتر تحت درمان با آلبندازول قرار گرفتند و زنده ماندن آنها در فواصل منظم مورد بررسی قرار گرفت. در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم برلیتر از آلبندازول، زنده ماندن پروتواسکولکس‌ها در یک دوره ۳۱ روز در مقایسه با گروه کنترل، به طور قابل توجهی کاهش یافت؛ درحالی که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم برلیتر، اثر چندانی نداشت (۲۲).

در مطالعه Taylor و همکاران (سال ۱۹۹۰)، با بررسی حداقل اثر داروی آلبندازول بر روی میزان زنده ماندن پروتواسکولکس‌ها در شرایط آزمایشگاهی، مشاهده گردید آلبندازول در غلظت ۵۰۰ میکروگرم برلیتر در مدت ۲۸ روز باعث از بین رفتن پروتواسکولکس‌ها شده است (۲۳).

Perez-Serrano و همکاران در مطالعه خود، با بررسی اثرات آلبندازول و آلبندازول سولفوکساید به تنهایی و با درمان ترکیبی دو دارو بر روی پروتواسکولکس‌های /کینوکوکوس گرانولوزوس در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند هنگامی که آلبندازول و آلبندازول سولفوکساید به صورت جداگانه به عنوان پروتواسکولوسیدال مورد استفاده قرار می‌گیرند، پس از یک دوره طولانی (۳۰ روز)، پروتواسکولکس‌ها را تا زمانی که به عنوان یک ترکیب استفاده شوند، از بین می‌برند (۲۴). برای دستیابی به مواد اسکولوسیدال مؤثر، لازم است که اثر این مواد بر روی پروتواسکولکس در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین، نگهداری پروتواسکولکس‌ها در یک محیط کشت مناسب برای زنده ماندن مهم است. تاکنون بسیاری از محیط‌های کشت برای حفظ و بررسی اثر این دارو بر روی پروتواسکولکس‌ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شده است. برخی محیط‌های کشت استفاده شده توسط محققین شامل: مایع

PBS، از آن برای نگهداری پروتواسکولکس‌ها استفاده کرد. در مطالعه حاضر از آغاز درمان با آلبندازول، حدوداً ۳۵ روز طول کشید تا تمامی پروتواسکولکس از بین بروند؛ درحالی که در درمان با داروی مبندازول بیش از ۴۵ روز زمان نیاز بود و نتایج به‌دست آمده نشان داد با مطالعات دیگران تقریباً همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده، به‌نظر می‌رسد که در درمان کیست هیداتیک، داروی آلبندازول مؤثرتر از مبندازول است و با توجه به مواردی مانند عود بیماری و انتشار ثانویه پس از جراحی، استفاده از این پروتواسکولوسیدال می‌تواند از نفوذ، انتشار و یا بازگشت بیماری جلوگیری کند. بنابراین، یک داروی جایگزین مناسب برای مبندازول است. براساس نتایج، از مقایسه بین دو محیط کشت، از PBS می‌توان به‌عنوان یک محیط ساده و مقرون به‌صرفه در شرایط آزمایشگاهی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نتایج این پژوهش آزمایشگاهی بخشی از یافته‌های پایان‌نامه (به شماره ۲۱۲۶۷)، دکتری نویسنده اول است که در آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده بهداشت، طی سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ انجام گرفت. بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت تأمین منابع مالی، همچنین از مدیر و تمامی کارکنان کشتارگاه سلمانیه شهر ری که در اجرای طرح همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

کیست هیداتیک، بافر PBS، هنکس، پارکر ۱۹۹، NTCT۱۳۵ و RPMI۱۶۴۰ بوده است (۲۵).

در مطالعه انجام‌شده توسط Zhang و همکاران، مشاهده گردید ۵٪ پروتواسکولکس‌ها در محیط RPMI۱۶۴۰ پس از ۶۰ روز زنده مانده‌اند (۲۶).

Casado و همکاران (سال ۱۹۸۶)، با نگهداری پروتواسکولکس‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط کشت M۱۹۹، نشان دادند پس از ۲۵ روز، ۲۸٪ از پروتواسکولکس زنده می‌مانند، درحالی که در محیط کشت PBS پس از ۵ روز هیچ پروتواسکولکسی زنده نمی‌ماند (۲۷).

همچنین در مطالعه دیگری (سال ۲۰۰۲)، Carmena و همکاران با استفاده از محیط کشت PBS غنی‌شده با ۱۰٪ گلوکز نشان دادند زنده ماندن پروتواسکولکس‌ها در کمتر از ۱۲ روز طول می‌کشد (۲۵). در مطالعات Virginio و همکاران (سال ۲۰۱۲) و Armena و همکاران (سال ۲۰۰۵)، به‌منظور کشت پروتواسکولکس، از محیط کشت PBS غنی‌شده با گلوکز ۱۰٪ استفاده شد (۱۱، ۱). در مطالعه حاضر، پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک در ۳۷ درجه سانتیگراد در دو محیط PBS و RPMI۱۶۴۰ به ترتیب بیش از ۶۰ و ۸۰ روز زنده ماندند.

تفاوت در میزان زنده ماندن پروتواسکولکس‌ها ممکن است به دلیل تنوع ژنتیکی انگل، سویه انگل و سن میزبان آلوده به کیست هیداتیک باشد (۲۸). در بررسی‌های انجام‌شده، مشاهده گردید زنده ماندن پروتواسکولکس‌ها در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ از محیط PBS، طولانی‌تر است و به دلیل غنی‌تر بودن این محیط کشت، می‌توان با اضافه کردن گلوکز (۱۰٪) به محیط کشت

References:

1. Virginio VG, Monteiro KM, Drumond F, de Carvalho MO, Vargas DM, Zaha A, et al. Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol* 2012;183(1):15-22.
2. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: A review. *Int J Infect Dis* 2009;13(2):125-33.
3. Balik AA, Basoglu M, Celebi F, Oren D, Polat KY, Atamanalp SS, et al. Surgical treatment of hydatid disease of the liver: Review of 304 cases. *Arch Surg* 1999;134(2):166-9.
4. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 2003;362(9392):1295-304.

5. Dalimi A, Motamedi GH, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol* 2002;105:161-71.
6. Saberi-Firouzi M, Kaffashian F, Hayati E, Ghaderi AA, Keshavarz H, Arshadi S. Prevalence of hydatidosis in nomadic tribes of southern Iran. *Med J Islam Repub Iran* 1998;12(2):113-18.
7. Zarif Fard MR, Abshar N, Akhavizadegan MA, Motamedi GR. Seroepidemiological survey of human hydatidosis in western part of Iran. *Arc Razi Ins* 1999;50:71-75. [Full Text in Persian]
8. Schantz PM. Parasitic zoonosis in perspective. *Int J Parasitol* 1991;21(2):161-70.
9. Yasawy MI, Mohamed AR, Al-Karawi MA. Albendazole in hydatid disease: Results in 22 patients. *Ann Saudi Med* 1992;12(2):152-6.
10. El-On J. Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. *Acta Trop* 2003;85(2):243-52.
11. Rabinson RD, Arme C. Echinococcus granulosus: Failure of the eosin exclusion test to demonstrate death of protoscoleces. *Ann Trop Med Parasitol* 1985;79(1):117.
12. Walker M, Rossignol JF, Torgerson P, Hemphill A. In vitro effects of nitazoxanide on Echinococcus granulosus protoscoleces and metacestodes. *J Antimicrob Chemother* 2004;54(3):609-16.
13. Carmena D, Martinez J, Benito A, Guisantes JA. Characterization of excretory-secretory products from protoscoleces of Echinococcus granulosus and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology* 2004;129(3):371-8.
14. Adas G, Arikan S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolical agents on hydatid cysts (in vitro study). *World J Gastroenterol* 2009;15(1):112-16.
15. Polat E, Aslan M, Cakan H, Saribas S, Ipek T, Kocazeybek B. The effects of albendazole and povidone iodine for hydatid cysts protoscoleces, in-vitro and -vivo. *Saudi J Gastroenterol* 2011;17(5):343-47.
16. Erzurumlu K, Hokelek M, Baris S, Sahin M, Birinci A, Amanvermez R, et al. Effect of albendazole sulfoxide solution on the scolices and the hepatobiliary system. *Eur Surg Res* 1998;30(6):433-8.
17. Anadol D, Ozcelik U, Kiper N, Göçmen A. Treatment of hydatid disease. *Paediatr Drugs* 2001;3(2):123-35.
18. Jung H, Hurtado M, Sanchez M, Medina MT, Sotelo J. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J Clin Pharmacol* 1992;32(1):28-31.
19. Aktan AO, Yalin R. Preoperative albendazole treatment for liver hydatid disease decreases the viability of the cyst. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8(9):877-9.
20. Hokelek M, Uyar R, Erurumlu K. The Investigation of the activity of Albendazol sulfone solution on the stability of the protoscolices of Echinococcus granulosus. *Turkiye Parazitolo Derg* 2001;25(1):41-4.
21. Morris DL, Chinnery JB, Ubhi C. A comparison of the effects of albendazole, its sulphone metabolite, and mebendazole on the viability of protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in an in vitro culture system. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81(5):804-6.
22. Chinnery JB, Morris DL. Effect of albendazole sulphoxide on viability of hydatid protoscoleces in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80(5):815-17.
23. Taylor DH, Morris DL, Richards KS. Perioperative prophylactic chemotherapy of *Echinococcus granulosus*: determination of minimum effective length of albendazole therapy in in vitro protoscoleces culture. *HPB Surg* 1990;2(3):159-64.
24. Pérez-Serrano J, Casado N, Guillermo, Denegri, Rodriguez-Caabeiro F. The effects of albendazole and albendazole sulfoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus* in vitro. *Int J Parasitol* 1994;24(2):219-24.

25. Carmena D, Benito A, Postigo L, Arteaga J, Martínez J, Guisantes JA. Short term culture of protoscoleces to obtain excretory-secretory proteins of *Echinococcus granulosus*. Rev Iber Parasitol 2002;62(3-4):84-88.
26. Zhang WB, Jones MK, Li J, McManus DP. *Echinococcus granulosus*: Pre-Culture of protoscoleces in vitro significantly increases development and viability of secondary hydatid cysts in mice. Exp Parasitol 2005;110(1):88-90.
27. Casado N, Rodriguez-Caabeiro F, Hernandez S. In vitro survival of *Echinococcus granulosus* protoscolices in several media, at +4 degrees C and +37 degrees C. Z Parasitenkd 1986;72(2):273-78.
28. Diker AI, Tinar R, Senlik B. Viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices at different conditions. Vet Parasitol 2007;150(1-2):84-87.