DOI: 10.22092/VJ.2022.357790.1949
شماره ۱۳۷ زمستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گل راعی (*Hypericum perfortum L.*) بر زنده‌مانی پروتواسکولکس‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در شرایط آزمایشگاهی

• **محمدحسین راضی‌جلالی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **سارا لرکی(نویسنده مسئول)**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **خسرو مهدی خانلو**
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **کوروش چراغی‌پور**
مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
• **عبدالرزاق مرزبان**
مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
• **کیومرث نورمحمدی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۱۱-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۱-۱۴
Emali: s.larki@scu.ac.ir

چکیده

از چالش‌های عمده درمان هیداتیدوزیس حین جراحی، از بین بردن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک جهت ممانعت از عود مجدد بیماری است. بدین منظور دستیابی به ترکیبات اسکولکس کش موثر و با عوارض جانبی کم ضروری می‌باشد. این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات اسکولکس کشی عصاره هیدروالکلی گیاه گل راعی و تغییرات فراساختاری پروتواسکولکس های تیمار شده صورت گرفته است. پس از جمع‌آوری کیست هیداتیک کبدی از کشتارگاه، مایع کیست حاوی پروتواسکولکس‌های زنده آسپیره و میزان زنده‌مانی آنها به کمک رنگ آمیزی ائوزین ۰/۱ ٪ سنجیده شد. سپس فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره هیدروالکلی گل راعی در غلظت‌های مختلف mg/ml ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ و مدت زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پروتواسکولکس‌های تیمار شده با عصاره بوسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ارزیابی و میزان سمیت عصاره توسط آزمایش MTT سنجیده شد. بیشترین فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی-الکلی گل راعی در غلظت mg/ml ۲۰۰ بعد از ۳۰ دقیقه مواجهه دیده شد که موجب از بین رفتن همه پروتواسکولکس‌های تیمار شده گردید. تغییرات ساختمانی در سطح میکروسکوپ الکترونی با آسیب وسیع تگومنت، بهم ریختگی روستلوم و قلاب‌ها و یکپارچگی غشاء تگومنت در پروتواسکولکس‌های تیمار شده مشاهده شد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی در مدت زمان ۲۴ ساعت ۵۶۴/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی گل راعی اثر پروتواسکولکس کشی قوی داشته و می‌تواند در حین جراحی به عنوان یک پروتواسکولکس کش مؤثر استفاده شود.

کلمات کلیدی: گل راعی، پروتواسکولکس کشی، کیست هیداتیک

Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 59-67

Evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of Hypericum perfortum L. on survival of Echinococcus granulosus protoscolices in vitro

By: Razi Jalali, M. H., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Larki S., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Mehdi Khanlou, K., Department of Production Engineering and Plant Genetics, College of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Cheraghipour, K., Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. Marzban, A., Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. and Nourmohammadi K., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Received: 2022-02-11 Accepted: 2022-04-03

Emali: s.larki@scu.ac.ir

Background: Hydrotidosis is a medical and veterinary disease that, in addition to causing significant economic damage to the livestock industry, can also threaten the health of humans. The elimination of hydatid cyst protoscolices is one of the major challenges of treating cysts during surgery. So, achieving an effective scolicidal compound with low side effects is essential for this purpose. In this study, St. John's Wort hydroalcoholic extract was used to evaluate protoscolices' viability and ultrastructural changes. Materials and Methods: After collecting hepatic hydatid cysts from the slaughterhouse, cyst fluid containing live protoscolices was aspirated under sterile conditions, then stored at 4 ° C in a refrigerator. Protoscolices were stained with 0.1% eosin to determine their survival rate. Then, the activity of the treated protoscolices with hydroalcoholic extract of St. John's wort was examined at different concentrations of 50, 100, 200, 300, 400, and 500 mg/ml for 10, 20, 30, and 60 minutes. For ultrastructural studies by scanning electron microscopy (SEM), the exposed protoscolices with plant extract were prepared. The growth inhibition was assayed using MTT (Methy Thiazol Tetrazolium) test. The result of the data was analyzed using statistical tests. Results: The highest protoscolecidal activity of Hypericum perfortum aqueous-alcoholic extract was observed at a concentration of 200 mg/ml after 30 minutes of exposure, resulting in the elimination of all treated protoscolices. Ultrastructural changes in treated protoscolices were observed as extensive tegument damage, loss of tegument integrity rostellum and hooks dislocation, and reduced protoscolices size. The half maximal inhibitory concentration (IC50) value was 564.8 mg/ml for 24 hours. Conclusion: The results of this study showed that the hydroalcoholic extract of St. John's wort has strong protoscolecidal effects. It can be used as an effective scolocidal composition in surgery methods.

Keywords: *Hypericum perfortum L.*, Protoscolecidal, Hydatid cyst.

مقدمه

اکینوکوکوزیس کیستی، از مهم‌ترین بیماریهای عفونی مشترک انسان و حیوان، در نتیجه ابتلا به مرحله نوزادی کرم نواری اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. کیست هیداتیک در اندام‌های مختلف بدن انسان و علفخواران می‌تواند موجب بیماری‌زایی شدید و کشنده شود. در حالی‌که سستود بالغ آن در روده باریک سگ و گوشتخواران استقرار یافته و علائم بالینی جدی ایجاد نمی‌کند. هیداتیدوزیس در بسیاری از نواحی جغرافیایی جهان همچون استرالیا، آمریکای جنوبی، خاورمیانه، شرق آفریقا، شرق اروپا و مناطق مدیترانه‌ای شیوع بالایی دارد (۲۳). این بیماری با توجه به میزان مرگ و میر قابل توجه، مشکلات بهداشت عمومی و ضررهای اقتصادی-اجتماعی فراوان، همچنان به عنوان یک بیماری نوپدید یا بازپدید در مناطق مختلف جهان محسوب می‌شود. بنابراین تلاش برای یافتن روش‌های مختلف درمانی و کاهش موارد ابتلا به کمک جراحی، اسپیراسیون و درمان دارویی بیماران مبتلا همچنان ادامه دارد. روش جراحی بعنوان یک روش ارجح درمان همواره با مخاطرات جدی ناشی از پاره شدن کیست‌ها و نشت محتویات آن به بافت‌های اطراف و در نتیجه عود مجدد بیماری با تشکیل کیست‌های ثانویه در اندام‌های مجاور همراه می‌باشد. بنابراین از جمله تمهیدات لازم جهت کاهش انتشار پروتواسکولکس‌ها و عود بیماری، بکارگیری مواد پروتواسکولکس کش مناسب مانند نمک هیپرتونیک ۲۰٪، نیترات نقره، فرمالین و ستریماید به

داخل کیست طی تکنیک سوراخ کردن، خالی کردن و تزریق ماده کشنده اسکولکس و دوباره تخلیه کردن از راه پوست (PAIR) می‌باشد. استفاده از ترکیبات شیمیایی غالبا همراه با بروز عوارض جانبی نظیر نکروز بافت‌های سالم مجاور، فیبروز مجاری صفرا، نکروز و سیروز کبدی بوده است (۱۹). ترکیبات طبیعی و گیاهی از زمان‌های گذشته به عنوان یک عامل ضدانگلی موثر در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی و انگلی بطور گسترده بکار می‌رفت که با فواید فراوانی از جمله هزینه کم، ایمنی بالا و دسترسی آسان همراه بود. در دهه گذشته مطالعات فراوانی بر روی اثرات اسکولیسیدال گیاهان مختلفی همچون گیاه آویشن، انار، مورد، سیاه دانه، سیر، زرشک، زنجبیل، درمنه و آویشن شیرازی صورت گرفته است (۱۲، ۸) که می‌توانند به عنوان منابع درمانی موثر هیداتیدوزیس بدون نگرانی از بروز مقاومت دارویی در بیماران تجویز شوند (۱۷).

گل راعی، گیاهی علفی، گلدار و پایا از تیره گل راعیان و متعلق به خانواده هیپریکاسه است که در ایران عموما به نام هوفاریقون و یا گل شهناز معروف می‌باشد. این گیاه با نام علمی هیپریکوم پرفوراتوم (Hypericum perforatum L.) به عنوان یک گیاه دارویی چندساله بومی اوراسیا است و به‌طور گسترده در مناطق معتدل اروپا (اوکراین و روسیه)، آسیا (ترکیه، هند و چین) و شمال آفریقا (خاورمیانه) (۶) و مناطق مختلفی از ایران از جمله دامنه کوه‌های البرز، چالوس، مازندران و نقاط غرب کشور به صورت خودرو در میان کشتزارهای گندم و ذرت روییده می‌شود. در طب سنتی، گیاه گل راعی خواص درمانی بسیاری دارد، این گیاه ضد کرم‌های دستگاه گوارش بوده و می‌تواند به عنوان ضدافسردگی، مدر، ضد درد، ضدعفونی کننده و ترمیم کننده زخم، سوختگی، آفتاب سوختگی، برص و نیش حشرات خزنده نیز مصرف شود (۱۳). همچنین نشان داده است که ترکیبات گیاه گل راعی دارای اثرات ضد انگلی بر علیه توکسوپلاسما گوندای (۲۲) و لیشمانیا پانامنسیس عامل لیشمانیوز پوستی (۱۸) می‌باشد. در سال‌های اخیر، مطالعات بسیاری به بررسی ترکیبات طبیعی گیاهی با فعالیت ضد پروتواسکولکس پرداخته‌اند که نتایج چشمگیری بدنبال داشته است. باتوجه به فواید درمانی فراوان این گیاه، مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت پروتواسکولکس کشی (پروتواسکولیسیدال) عصاره هیدروالکلی گل راعی در محیط آزمایشگاه صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک

در این پژوهش تجربی، کیست‌های هیداتیک تک حفره‌ای از کبدهای آلوده گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه گلشن شهر خرم‌آباد جمع‌آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی انتقال و با رعایت شرایط اسپتیک و به کمک سرنگ استریل، محتویات کیست‌های بارور آسپیره و در لوله‌های آزمایش مجزا ریخته شد. کیست‌های چرکی و کلسیفیه شده از مطالعه خارج شدند. پس از ۳۰ دقیقه سکون، پروتواسکولکس‌های مایع هیداتیک ته‌نشین و از مایع رویی جداسازی و با نرمال سالین شستشو شدند. سپس درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها به کمک رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین ۰/۱ ٪ (یک گرم پودر ائوزین در ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که حجم یکسان مشخصی از مایع حاوی پروتواسکولکس و محلول رنگ ائوزین ۰/۱ ٪ را روی لام ریخته و پس از ۱۰ دقیقه زنده مانی پروتواسکولکس‌ها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. پروتواسکولکس‌های زنده به علت حفظ تمامیت غشا، بدون رنگ و دارای حرکت ضربان‌دار سلول‌های شعله‌ای بودند، در حالی‌که پروتواسکولکس‌های مرده به دلیل از دست رفتن خاصیت نفوذپذیری انتخابی غشا، به رنگ صورتی مایل به قرمز مشاهده و تحت شمارش قرار گرفتند (شکل ۱). محتویات کیست‌های بارور با بیش از ۹۰ ٪ زنده‌مانی جهت مطالعات برون‌تنی عصاره گل راعی در محیط کشت (RPMI ۱۶۴۰) نگهداری شدند.

تهیه و آماده سازی عصاره هیدروالکلی گل راعی

به منظور تهیه و تخلیص عصاره هیدروالکلی گل راعی، در ابتدا گیاه از مراکز تولید گیاهان دارویی شهرستان خرم‌آباد، استان لرستان خریداری و گونه آن توسط مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان تایید شد (۱). بخش‌های هوایی گیاه مورد نظر شامل گل و برگ‌های آن پس از خشک شدن در سایه، بوسیله آسیاب برقی به خوبی خرد شدند. در هر بار عصاره‌گیری ۱۰۰ گرم پودر آسیاب شده گیاه با یک لیتر حلال هیدروالکلی (اتانول ۷۰ ٪) مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت در ظرف مناسبی نگهداری گردید. این ظرف بر روی دستگاه شیکر هر ۱۲ ساعت یکبار برای مدتی تکان داده شد و پس از ۷۲ ساعت محتویات مخلوط شده جهت تکمیل فرایند عصاره‌گیری، از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده و صاف گردید. عصاره حاصل توسط دستگاه دوار (روتاری) تغلیظ و پس از نگهداری در آون ۵۰ c ، به طور کامل خشک شد. عصاره آماده شده تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید.

بررسی فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره هیدروالکلی گل راعی

در این مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاه گل راعی با غلظت‌های مختلف (۵۰ mg/ml، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰) در مجاورت پروتواسکولکس‌های جمع‌آوری شده کیست هیداتیک در مدت زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی قرار داده شد. برای تهیه غلظت‌های موردنظر مقدار مشخصی (۰/۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گرم) از عصاره هیدروالکلی گیاه گل راعی با ۱۰ میلی‌لیتر نرمال سالین در لوله‌ای مجزا مخلوط و محتویات آن با مگنت هم زده شد. سپس به هر کدام از لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره، حجم یکسانی (۵۰۰ میکرولیتر، تقریبا برابر ۱۰۰۰ پروتواسکولکس) از محلول حاوی پروتواسکولکس افزوده و به آرامی مخلوط گردید. محتویات لوله‌ها طی مدت زمان‌های مختلف در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اتاق نگهداری شد تا پروتواسکولکس‌های مطالعه تیمار گردند. پس از مدت زمان‌های موردنظر مایع رویی رسوب پروتواسکولکس دور ریخته و پروتواسکولکس‌های تیمار شده با نرمال سالین شستشو داده شدند. سپس با کمک پیپت پاستور استریل و پس از همگن کردن هر لوله بطور مجزا، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول غنی‌شده پروتواسکولکس با حجم یکسان از محلول رنگ ائوزین ۰/۱ ٪ روی لام مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه به کمک میکروسکوپ نوری درصد زنده مانی پروتواسکولکس‌های تیمار شده محاسبه گردید. جهت جلوگیری از خطای آزمایش، برای هریک از غلظت‌های عصاره در زمان‌های مختلف سه بار تکرار در نظر گرفته شد. در این مطالعه از نرمال سالین ۰/۹ ٪ به عنوان

کنترل منفی و از نمک هیپرتونیک ۲۰ ٪ به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

بررسی میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) پروتواسکولکس های تیمار شده با عصاره

به منظور بررسی تغییرات فراساختاری پروتواسکولکس‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گل راعی، پروتواسکولکس‌های گروه آزمایش (مجاور یافته با ۱۰۰ mg/ml عصاره به مدت ۱ ساعت) و پروتواسکولکس‌های گروه کنترل منفی پس از شستشو با نرمال سالین به مدت ۴ ساعت با گلوتارآلدئید ۲٫۵ ٪ در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شدند. نمونه‌های فیکس شده در غلظت‌های بالارونده الکل(۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ ٪) هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه آبگیری شدند. سپس آنها را به مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه خشک کن نقطه بحرانی (Hitachi, ,Critical Point Dryer S۴۱۶۰ Japan) خشک و پس از پوشش با لایه نازکی طلا با استفاده از واحد پوشش (Polaron, UK E۵۱۰۰)، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope JOEL ,۶۴۰۰۰ Japan) با ولتاژ شتاب ۱۵ تا ۲۵ کیلوولت عکسبرداری صورت گرفت.

مطالعه فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گل راعی

خصوصیات فیتوشیمیایی ترکیبات فعال زیستی در عصاره گیاه پس از آماده‌سازی و با استفاده از پروتکل‌های زیر به صورت کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت سنجش فلاونوئید، یک محلول متانولی از نیترات آلومینیوم (W/V ۱۰ ٪) و استات سرب (W/V ۰/۱ ٪) به صورت قطره‌ای به عصاره هیدروالکلی گل راعی اضافه شد. بعد از یک لحظه تغییر رنگ نمونه به رنگ زرد نشان‌دهنده وجود فلاونویید در عصاره هیدروالکلی گل راعی بود (۲۱). جهت سنجش ترپنوئیدها، دو میلی‌لیتر کلروفرم به پنج میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه راعی اضافه شد. با تبخیر آب محلول، سه میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ جوشانده شده به آن اضافه گردید، رنگ خاکستری حاصل نشان دهنده وجود ترپنوئید در عصاره می‌باشد (۱۱). جهت سنجش ساپونین، به پنج میلی‌گرم از عصاره هیدروالکلی گل راعی، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و به شدت تکان داده شد. وجود یک لایه کف روی نمونه، نشان دهنده وجود ساپونین در عصاره گیاه بود (۱۱). جهت سنجش گلیکوزیدهای استروئیدی، ارزیابی وجود گلیکوزید در عصاره هیدرو الکلی گل راعی به دو طریق صورت گرفت. در روش اول، ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و حجم یکسان از کلروفرم با عصاره گیاهی مخلوط و بعد از سرد شدن، یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه گردید. وجود رنگ سبز نشان‌دهنده وجود گلیکوزیدهای استروئیدی در عصاره گیاه بود. در روش دوم، سه میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال را با دو میلی‌لیتر محلول کلریدآهن مخلوط، سپس هفت میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی گل راعی به آن افزوده گردید. در انتها با اضافه کردن یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به محلول حاصل و مشاهده یک حلقه قهوه‌ای رنگ در بین لایه‌های تشکیل شده، نشان‌دهنده وجود گلیکوزیدهای استروئیدی در عصاره گیاه بود. با افزودن دو میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به عصاره هیدروالکلی گل راعی سنجیده شد. تشکیل رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز نشان دهنده وجود آگلیکون استروئیدی (بخشی از گلیکوزید) در عصاره مورد آزمایش بود (۱۱). جهت سنجش آنتراکونین، ابتدا شش گرم پودر عصاره گل راعی را به ۱۰ میلی‌لیتر محلول بنزن افزوده و پس از مدت زمان ۱۰ دقیقه جهت خیس خوردن عصاره، مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر گردید. به فیلتراسیون حاصل ۱۰ میلی‌لیتر آمونیاک ۱۰ ٪ افزوده شد. پس ۳۰ ثانیه تکان دادن شدید، ایجاد رنگ صورتی، بنفش یا قرمز تیره نشان دهنده وجود آنتراکونین در فاز آمونیاکی عصاره موردنظر بود (۱۱).

سنجش میزان سمیت عصاره هیدروالکلی گل راعی

در این مطالعه رده سلولی Raw ۲۶۴,۷ IBCC۱۱۳۲۴ ماکروفاژهای موشی از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. برای تکثیر و کشت رده سلولی ماکروفاژی از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ MemoriaL (Institute۱۶۴۰) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovin Serum) و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین در شرایط استاندارد انکوباتور (دمای ۳۷ سانتی‌گراد و ۵٪ Co_2 و رطوبت ۹۵ ٪) استفاده گردید. برای سنجش اثر سمیت سلولی ترکیب عصاره هیدروالکلی گل راعی از آزمون متیل تترازولوم (MTT) که یک روش رنگ‌سنجی است، استفاده شد. در این روش نمک تترازولیوم (Tetrazolium salt) زرد رنگ، توسط آنزیم‌های سوکسینات دهیدروزناز میتوکندریایی سلول‌های زنده به یک ترکیب ارغوانی رنگی به نام فورمازان نامحلول تبدیل می‌شود. جذب نوری این ترکیب پس از حل شدن آن در محلول DMSO (Dimethyl Sulfoxide) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری گردید (۹). پس از چند بار پاساژ متوالی و پوشیده شدن کف فلاسك از یک لایه سلولی، به کمک PBS (Phosphate Buffered-Saline) استریل (شرکت سیناژن، ایران) این لایه سلولی چسبیده از کف فلاسك جدا و به فالکن استریل منتقل گردید تا به مدت ۷ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردد. پس از شمارش سلول‌های سوسپانسیون سلولی تهیه شده در زیر لام هموسیتومتر، به میزان ۱۰۵ سلول به هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای افزوده گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوباتور قرار داده شدند. سپس رقت‌های مناسب از عصاره هیدروالکلی گل راعی (۴۰۰ mg/ml، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و غلظت‌های mg/ml ۳۰۰، ۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷۵ و همچنین غلظت‌های mg/ml ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵) تهیه و پس از برداشت مایع رویی چاهک‌ها، به سلول‌های کشت داده شده در پلیت اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گردید. پس از طی این مدت، به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از محلول زرد رنگ ۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه و پلیت ها مجددا به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج و به هرچاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید تا فورمازان حاصل حل گردد. پس از ۱۰ دقیقه و تکان دادن پلیت، تغییر رنگ حاصل توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. چاهک‌های حاوی سلول و بدون عصاره به عنوان گروه کنترل و چاهک‌های بدون سلول و حاوی DMSO و محیط کشت به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. درصد سمیت عصاره بر رده سلولی ماکروفاژ موش (Raw ۲۶۴,۷) و ارزیابی داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین و در قالب نمودار با نرم‌افزار گراف پدپریسم انجام گردید.

تحلیل آماری

برای تعیین تفاوت مابین و داخل گروه‌ها از آزمون‌های ANOVA و t استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) در سطح معناداری (P<۰/۰۵) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

بررسی اثر ضد پروتواسکولکسی عصاره هیدروالکلی گل راعی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)

فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی-الکلی گل راعی بر حسب زمان و رقت‌های مختلف در مقایسه با سرم فیزیولوژی وآب نمک اشباع در جدول یک آمده است. تفاوت مقادیر حیات پروتواسکولکس‌ها پس از مواجهه، نسبت به مقادیر حیات قبل از مواجهه به عنوان فعالیت پروتواسکولکس کشی در نظر گرفته می‌شود (شکل ۱).

نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره گیاه گل راعی در تمام غلظت‌ها در بازه‌های زمانی ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه اثرات ضدپروتواسکولکسی وابسته به دوز قابل توجهی را در مقایسه با گروه کنترل داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۱). میزان کشندگی پروتواسکولکس‌ها پس از ۱۰ دقیقه مواجهه با غلظت ۵۰۰ mg/ml عصاره گل راعی ۱۰۰ ٪ بود، در حالیکه در غلظت ۲۰۰ mg/mll عصاره گیاه در مدت ۶۰ دقیقه ویژگی اسکولکس کشی را نشان داد. یافته‌ها نشان دادند که با افزایش زمان مواجهه عصاره در تمام غلظت‌ها میزان کشندگی به مقدار قابل توجهی افزایش یافت (P<۰/۰۵). میزان کشندگی پروتواسکولکس‌ها در گروه کنترل منفی و مثبت به ترتیب ۴/۵۶ و ۹۶/۱۸ ٪ پس از ۱۰ دقیقه مواجهه با عصاره گل راعی بود.

تغییرات فراساختاری پروتواسکولکس های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گل راعی توسط میکروسکوپ الکترونی(SEM)

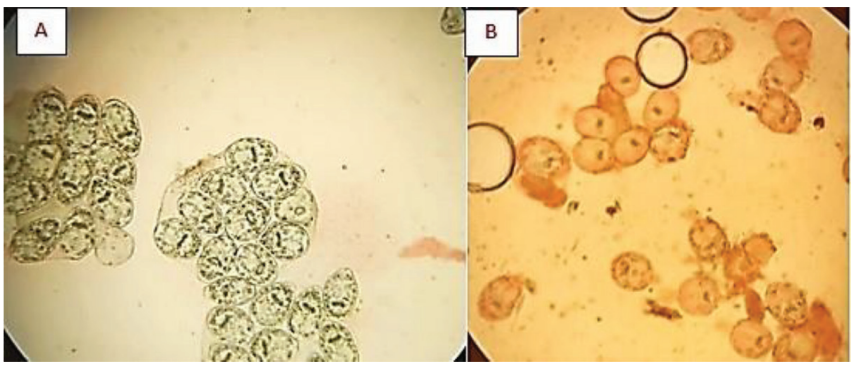
مواجهه یک ساعته پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک با غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره آبی-الکلی گل راعی در دمای اتاق، موجب تغییرات ساختار سطحی پروتواسکولکس‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل گردید. این تغییرات شامل کاهش ابعاد، چروکیدگی سطحی پروتواسکولکس‌ها، دناتوره و تخریب شدن سطوح تگومنت، قلاب‌ها و بادکش‌ها بود (شکل ۲).

خصوصیات فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گل راعی

نتایج تست‌های فیتوشیمیایی عصاره گل راعی در جدول دو بصورت تفصیلی بیان شده است. نتایج آنالیز فیتوشیمیایی عصاره نشان‌دهنده وجود ترکیبات فعال زیستی نظیر ساپونین، فلاونوئید، ترپنوئید، استروئید، گلیکوزید و آنتراکوئینین در گل راعی بود.

بررسی سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گل راعی

درصد زنده مانی غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گل راعی با استفاده از آزمون تعقیبی LSD با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمایش MTT بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون رده سلول‌های ۲۶۴,۷ Raw IBCC۱۱۳۲۴ ماکروفاژهای موش با غلظت‌های مختلف عصاره نشان داد که اثر عصاره هیدروالکلی گل راعی در زمان ۲۴ ساعت از غلظت ۹/۳۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از آن در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار شد (P<۰/۰۵) . IC۵۰ (half-maximal inhibitory concentration) در زمان ۲۴ ساعت ۵۶۴/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد (شکل ۳). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، عصاره گیاه در غلظت‌های ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین میزان مهار رشد سلول‌های ماکروفاژ به ترتیب به میزان ۵۰/۴۵±۲/۹۷ و ۵۷/۹±۰/۶۴ داشته است. همانطور که در نمودار یک مشاهده می‌شود با افزایش غلظت عصاره، در صد مهار رشد کاهش پیدا کرد، هرچند در غلظت‌های ۲۵ و ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شیب کاهش رشد بیشتر نمود یافت. نتایج بدست آمده را می‌توان ناشی از اثر عوامل محرك رشد موجود در عصاره



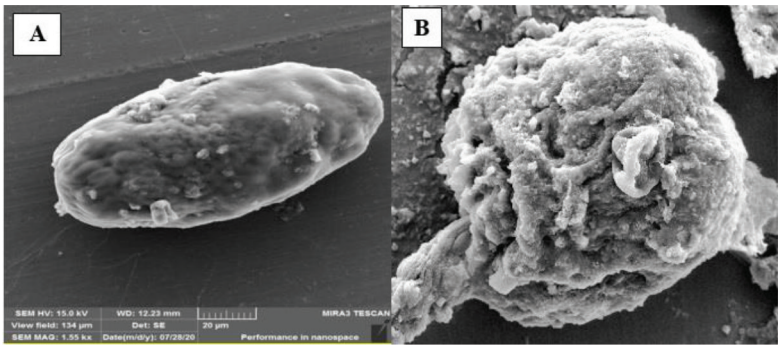
شکل ۱- (A پروتواسکولکس زنده (بی رنگ) ، (B پروتواسکولکس مرده (رنگ گرفته(تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی گل راعی، رنگ آمیزی شده با ائوزین ۰/۱٪.

هیدروالکلی گل راعی در غلظت‌های بالاتر دانست که اثر سمیت سلولی ترکیبات موجود در این عصاره را خنثی می‌کنند.
هیداتسیدوزیس علاوه بر مشکلات بهداشت عمومی، سالیانه خسارات اقتصادی بالغ بر ۲۰۰ میلیون دلار بر اقتصاد کشور وارد می‌کند که استفاده از روش‌های جراحی و تکنیک سوارخ، اسپیره، تزریق مواد اسکولیسیدال و اسپیراسیون مجدد (PAIR) از مناسب‌ترین و موثرترین روش‌های درمانی آن محسوب می‌شود. با این وجود استفاده از ترکیبات شیمیایی کشنده پروتواسکولکس نظیر محلول نمک هیپرتونیک ۲۰ ٪، نیترات نقره ۲۰ ٪، بتادین، اتانول و غیره افراد را با عوارض جانبی جدی و خطرناک نظیر پارگی، نشت کیست و متعاقبا شوك آنافیلاکسی و همچنین عود کیست در بدن روبرو می‌کند (۱۶). بنابراین محققان را به سمت یافتن ترکیبات طبیعی اسکولیسیدال با قابل دسترسی و کارایی بالا و همچنین حداقل عوارض جانبی نظیر ترکیبات گیاهی سوق داد. در متون مختلف مشاهده شده است که گیاه گل راعی دارای خصوصیات درمانی بسیار زیادی مانند ترمیم زخم، برطرف کننده بی‌نظمی‌های افسردگی، ضد اضطراب و تشنج، آنتی‌اکسیدان قوی، ضدمیکروبی، ضدویروسی و ضدقارچی می‌باشد. این اثرات درمانی گیاه به وفور ترکیبات فعال زیستی نظیر فلاونوئیدها، گزانتون‌ها، تانن‌ها، فلوروگلوسینول و نافتودیانتروس

جدول ۱- فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره هیدروالکلی گل راعی بر حسب غلظت و زمان‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار).

غلظت عصاره (mg/ml)	میزان کشندگی پروتوسکولکس (٪) در مدت زمان تیمار (دقیقه)				میانگین کشندگی پروتواسکولکس (٪)
	۱۰	۲۰	۳۰	۶۰	
۵۰	۹/۴۶±۱/۷۶	۲۴/۹۹±۰/۹۸	۴۱/۰۸±۱/۰۴	۵۳/۰۹±۱/۷۲	۳۲/۱۵±۱۶/۵۲
۱۰۰	۱۹/۳۴±۱/۱۲	۴۳/۰۲±۱/۰۳	۷۷/۲۹±۲/۰۲	۸۸/۰۷±۱/۳۶	۵۶/۹۳±۲۷/۳۸
۲۰۰	۳۰/۹۷±۱/۵۹	۷۷/۰۳±۱/۶۲	۹۵/۲۱±۱/۴۷	۱۰۰±۰/۰۰	۷۵/۸۰±۲۷/۲۹
۳۰۰	۸۹/۳۰±۰/۳۰	۹۹/۵۵±۰/۴۸	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۹۷/۲۱±۴/۵۸
۴۰۰	۹۵/۰۸±۰/۴۷	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۹۸/۷۷±۲/۱۴
۵۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰
*کنترل منفی	۴/۵۶±۱/۸۱	۶/۱۰±۱/۱۰	۹/۴۸±۲/۸۶	۱۴/۳۱±۳/۷۵	۸/۵۹±۴/۵۷
**کنترل مثبت	۹۶/۱۸±۲/۱۳	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۹۹/۰۴±۱/۹۶

هریک از آزمایش‌ها در سه مرحله تکرار شد. * نرمال سالین ۰/۹ ٪، ** نمک هیپرتونیک ۲۰ ٪.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، پروتواسکولکس های کیست هیداتیک. A) پروتواسکولکس نرمال (تیمار نشده). B) پروتواسکولکس تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گل راعی.

جدول ۲- بررسی کیفی خصوصیات فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گل راعی.

ترکیبات فیتوشیمیایی	عملکرد عصاره	آزمون های انجام شده	ظاهر شدن نتایج
ساپونین ها	+	آزمون کف کنندگی	تشکیل لایه ای کف آلود
فلاونوئیدها	+	آزمون شینودا (Shinoda)	زرد رنگ شدن
ترپنوئیدها	+	آزمون برای ترپنوئید	خاکستری رنگ شدن
استروئیدهای گلیکوزیدی	+	آزمون کلرکیلیانی (Keller-Kiliani)	قرمز رنگ شدن
گلیکوزیدها	+	آزمون لیبرمن (Liebermann)	سبز یا قهوه ای شدن
انتراکوئینین	+	آزمون برای انتراکوئینین	قرمز، صورتی یا بنفش شدن

+ حضور ترکیبات فیتوشیمیایی در عصاره گیاهی.

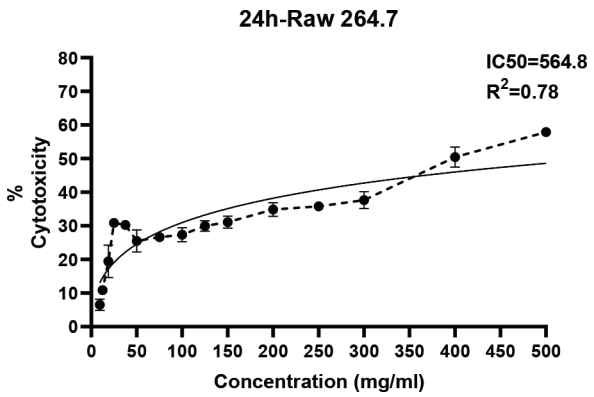
جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گل راعی بر مهار رشد رده سلولی Raw ۲۶۴,۷ ماکروفاژ.

غلظت عصاره گل راعی (mg/ml)	جذب نوری (میانگین±انحراف معیار)	اثر مهار کنندگی (میانگین±انحراف معیار)	IC۵۰ (mg/ml)
۹/۳۷	۱/۰۲ ± ۰/۰۱	۰/۱۵ ± ۱۵/۶۱	۵۶۴/۸
۱۲/۵	۰/۹۷ ± ۰/۰	۱۵/۳۴ ± ۷/۸۲	
۱۸/۷۵	۰/۸۸ ± ۰/۰۴	۱۹/۴۶ ± ۱۲/۸۳	
۲۵	۰/۷۵ ± ۰/۰۱	۳۰/۸۴ ± ۱/۴۰	
۳۷/۵	۰/۷۶ ± ۰/۰۱	۳۰/۲۹ ± ۱/۳۰	
۵۰	۰/۸۴ ± ۰/۰۲	۲۵/۵۰ ± ۳/۲۹	
۷۵	۰/۸۰ ± ۰/۰۲	۲۶/۶۶ ± ۰/۲۳	
۱۰۰	۰/۷۹ ± ۰/۰۱	۲۹/۴۳ ± ۱۷/۱۱	
۱۲۵	۰/۷۶ ± ۰/۰۱	۲۹/۹۸ ± ۱/۵۵	
۱۵۰	۰/۷۵ ± ۰/۰۱	۳۱/۰۸ ± ۱/۸۳	
۲۰۰	۰/۷۱ ± ۰/۰۱	۳۴/۸۳ ± ۲/۰۶	
۲۵۰	۰/۷۰ ± ۰/۰	۳۵/۸۱ ± ۰/۰۵	
۳۰۰	۰/۶۸ ± ۰/۰۲	۳۶/۶۰ ± ۷/۸۴	
۴۰۰	۰/۵۴ ± ۰/۰۲	۵۰/۴۵ ± ۲/۹۷	
۵۰۰	۰/۴۶ ± ۰/۰	۵۷/۹۰ ± ۰/۶۴	
کنترل	۱/۰۹ ± ۰/۰۳	۰ ± ۰/۴۶	

نتایج میانگین±انحراف معیار با سه تکرار بیان شده است.

(هیپرسین، پزودوهیپرسین، پروتوپزودوهیپرسین و پروتوهیپرسین) موجود در گیاه نسبت داده می‌شود (۱۰).

در سال‌های اخیر تحقیقات متعددی به بررسی اثرات ضد پروتواسکولکسی برخی گیاهان دارویی مانند گیاه آویشن، انار، مورد، سیاه دانه، سیر، زرشک و غیره پرداخته‌اند (۱۲) که نشان دهنده اثرات ضدانگلی بالقوه این ترکیبات طبیعی می‌باشد. یافته‌های آزمایشگاهی مطالعه حاضر نشان داد که میزان کشندگی پروتواسکولکس‌ها پس از ۱۰ دقیقه مواجهه با غلظت ۵۰۰ mg/ml عصاره آبی-الکلی گل راعی ۱۰۰ ٪ بود. از مهم‌ترین خصوصیات یک پروتواسکولکس کش خوب می‌توان به کارایی بالا در دوزهای پایین، تاثیرگذاری بیشتر در مدت زمان‌های کوتاه، پایداری آن در مایع کیست، قابلیت دسترسی و سمیت پایین آن اشاره کرد (۸). نتایج حاصل از آنالیز فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گل راعی نشان داد که این گیاه با داشتن ترکیباتی همچون ساپونین، فلاونوئید، ترپنوئید، گلیکوزیدهای استروئید و آنتراکوئینین اثرات ضد پروتواسکولکسی قابل توجهی دارد. همچنین وجود ترکیبات فنولی موجود در عصاره، توانایی مهار رشد سلول‌های ماکروفاژ با IC۵۰ در غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر دارا می‌باشد. از این جهت عصاره هیدروالکلی گل راعی ترکیب بسیار ایمن و بی‌خطر برای سلول‌های زنده بدن می‌باشد. در مطالعات صورت گرفته بر روی عصاره و اسانس گل راعی، نقش ضد انگلی این گیاه را به فراوانی ترکیبات فیتوشیمیایی بدست آمده از مطالعه حاضر نسبت داده‌اند. شبستری و همکاران (۲۰۱۷) نقش ضد انگلی گل راعی بر علیه کیست‌های اکانتامبا را با مشتقات آنتراکینونی (نفتودیانترون‌ها)، فلاونوییدها، فلوروگلوسینول‌ها، تانن‌ها، برخی از فنل‌ها، روغن‌های فرار، هیپرفورین و هیپریسین موجود در گیاه مرتبط دانسته‌اند (۲). همچنین مشاهده شده است که ترکیب اصلی گیاه به نام هیپرفورین مانع از رشد و تکثیر انگل بافت عصبی توکسوپلاسما گوندای در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۲۲). ترکیب اصلی دیگر گیاه بنام هیپریسین نیز دارای فعالیت ضد انگلی مشابه بر علیه کرم بالغ شیستوروما ژاپونیکوم می‌باشد (۴).



نمودار ۱- درصد فعالیت مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی گل راعی بر رده سلول‌های IBCC۱۱۳۲۴ Raw ۲۶۴,۷ در مدت ۲۴ ساعت.

خاصیت ضد پروتواسکولکس‌کشی الکالوئیدها در متابولیت‌های گیاهان مختلفی گزارش شده است. از جمله ساپونین دارای خاصیت ضد فعالیت تریکوموناس واژینالیس (۷) و همچنین ترکیب دیگر گیاه بنام ترپنوئید، فعالیت ضدانگلی بر علیه همه مراحل تکاملی تریپانوزوم کروزی (۲۰) دارد. سایر متابولیت‌های گیاه گل راعی مانند تانن‌ها و فلاونوئیدها در سایر ترکیبات گیاهی مانند پوست میوه انار، برگ‌های کَبَر، چریش و مورد و سایر گیاهان غنی از تانن نیز یافت شده است که دارای اثرات مناسبی علیه کیست هیداتیک (۱۴) می‌باشد.

همچنین یافته‌های بدست آمده از ارزیابی فراساختاری پروتواسکولکس‌های تیمار شده با عصاره گل راعی، بهم ریختگی ساختار تگومنت و روستلوم و تغییر شکل و ابعاد پروتواسکولکس‌ها را نشان داد. یافته‌های مشابه‌ای در مطالعات متعدد دیگر ترکیبات گیاهی بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) گزارش شده است، مانند عصاره متانولی فلفل بلند هندی (۵)، علف شور یا گیاه سلمکی (۳)، روغن‌های فرار میخک (۱۵) که موجب چروک شدن تگومنت و از بین رفتن بادکش‌ها و قلاب‌های پروتواسکولکس‌ها شده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

گل راعی سال‌هاست به عنوان داروی ضدافسردگی مناسب مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعه حاضر نشان داد با توجه به ایمن بودن بالای عصاره هیدروالکلی گل راعی در برابر سلول‌های زنده از آن می‌توان به عنوان یک ماده اسکولیسیدال مناسب در جراحی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان‌نامه‌ی D. Ph انگل شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده اند، اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

1. Assadi, M., A. A. Ramak Maassoumi, M. Khatamsaz, V. Mozaffarian. 1990-2020. Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangeland Press. Tehran. (In Farsi).

2. Arjmand-Shabestary, A., M. Khaloei, M. Arjomandzadegan, Z. Eslamirad and R. Ghasemikhah. 2017. Effects of Zataria, Mentha Pulegium, Oregano spp Essential Oil and Hydroalcholic Extract of Hypericum perforatum on Cyst of Acanthamoeba spp In Vitro. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 20(8) :1-8

3. Bouaziz, S., M. Amri, N. Taibi, R. Zeghir-Bouteldja, A. Benkhaled, D. Mezioug and C. Touil-Boukoffa. 2021. Protoscolicidal activity of Atriplex halimus leaves extract against Echinococcus granulosus protoscoleces. *Experimental parasitology*. 229: 108155.

4. Cai, R., X. P. She, Y. Wang, W. Gong, H. Q. Zhang and C. M. Xia. 2014. In vitro effect of photoactivated hypericin on anti-Schis-

tosoma japonicum adult male worms. *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 32(3): 176-179.

5. Cheraghipour, K., M. Beiranvand, M. Zivdari, S. Amiri, L. Masoori, M. Nourmohammadi, A. S. Maken-Ali, S. Abbaszadeh, K. Moradpour and A. Marzban. 2021. In vitro potential effect of Pipper longum methanolic extract against protoscolices of hydatid cysts. *Experimental Parasitology*. 221: 108051.

6. Crompton, C., I. Hall, K. Jensenm and P. Hildebrand. 1988. The biology of Canadian weeds. 83. Hypericum perforatum L. *Canadian Journal of Plant Science*. 68(1): 149-162.

7. De-Brum-Vieira, P., N. L. F. Silva, C. B. Menezes, M. V. da-Silva, D. B. Silva, N. P. Lopes, A. J. Macedo, J. Bastida and T. Tasca. 2017. Trichomonicidal and parasite membrane damaging activity of bidesmosic saponins from Manilkara rufula. *PLoS One*. 12(11): e0188531.

8. Feizi, F., S. Moradkhani, M. Matini, F. Parandin, A. Roushan and M. Fallah. 2015. To study the solicidal effects of the extracts of Ginger (Zingiber officinale) and Artemisia (Artemisia aucheri) on protoscoleces of hydratid cyst in vitro. *Arak Medical University Journal*. 18(101): 45-52.

9. Galati, G. and P. J. O'Brien. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free radical biology & medicine*. 37(3): 287–303.

10. Ghasemi-Pirbalouti, A., G. R. Rahnama, F. Malekpoor and H. Roohi Broujeni. 2011. Variation in antibacterial activity and phenolic content of Hypericum scabrum L. populations. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5(17): 4119-4125.

11. Gul, R., S. U. Jan, S. Faridullah, S. Sherani and N. Jahan. 2017. Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant activity of crude plant extracts from Ephedra intermedia indigenous to Balochistan. *Scientific World Journal*. 3: 1-7.

12. Kohansal, M. H., A. Nourian, M. T. Rahimi, A. Daryani, A. Spotin and E. Ahmadpour. 2017. Natural products applied against hydatid cyst protoscolices: A review of past to present. *Acta tropica*. 176: 385-394.

13. Kraft, K. and C. Hobbs. Pocket Guide to Herbal Medicine. pp.115-119. Thieme Stuttgart. New York.

14. Labsi, M., L. Khelifi, D. Mezioug, I. Soufli and C. Touil-Boukoffa. 2016. Antihydatic and immunomodulatory effects of Punica granatum peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 9(3): 211-220.

15. Maurice, M. N., E. Huseein, M. Monib, F. M. Alsharif, N. I. Namazi, and A. A. Ahmad. 2021. Evaluation of the scolicidal activities of eugenol essential oil and its nanoemulsion against protoscoleces of hydatid cysts. *Plos one*. 16(11): e0259290.

16. McManus, D. P., W. Zhang and J. Li. 2003. Echinococcosis. *Lancet*. 362: 1295– 1304.

17. Moloudizargari, M., P. Mikaili, S. Aghajanshakeri, M. H. Asghari and J. Shayegh. 2013. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. *Pharmacognosy reviews*. 7(14): 199.

18. Montoya, A., A. Daza, D. Muñoz, K. Ríos, V. Taylor, D. Cedeño, I. D. Vélez, F. Echeverri and s. M. Robledo. 2015. Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on photodynamic therapy in in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(9): 5804-5813.

19. Rajabi, M. A. 2009. Fatal reactions and methaemoglobinaemia after silver nitrate irrigation of hydatid cyst. *Surgical practice*. 13(1): 2–7.

20. Ramírez-Macías, I., C. Marín, R. Chahboun, I. Messouri, F. Olmo, M. J. Rosales, R. Gutierrez-Sánchez, E. Alvarez-Manzaneda and M. Sánchez-Moreno. 2012. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of four terpenoid derivatives against Trypanosoma cruzi. *American journal of tropical medicine and hygiene*. 87(3): 481–488.

21. Sen, S., B. De, N. Devanna and R. Chakraborty. 2013. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of Meyna spinosa Roxb., an Indian medicinal plant. *Chinese journal of natural medicines*. 11(2): 149-157.

22. Shinjyo, N., H. Nakayama, L. Li, K. Ishimaru, K. Hikosaka, N. Suzuki, H. Yoshida and K. Norose. 2021. Hypericum perforatum extract and hyperforin inhibit the growth of neurotropic parasite Toxoplasma gondii and infection-induced inflammatory responses of glial cells in vitro. *Journal of ethnopharmacology*. 267: 113525.

23. Zulfikaroglu, B., N. Ozalp, M. Keskek and M. Koc. 2008. Primary echinococcal cyst of the thyroid: report of a case. *Surgery today*. 38: 833–835.