DOI:10.22092/VJ.2023.361562.2053
شماره ۱۴۱ زمستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثر کشندگی پپتید CM۱۱ بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید

• **علی فتح‌آبادی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **الهه ابراهیم‌زاده(نویسنده مسئول)**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **حسن برجی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **نیما کمیلی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۱۲-۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲-۰۲-۳۱
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲-۰۲-۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۱۰-۰۱
Emali: eebrahimzade@um.ac.ir

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی اثر کشندگی پپتید ضد میکروبی CM۱۱ (پپتید خطی آلفا هلیکال با ۱۱ اسید آمینه) بر روی کیست هیداتید گوسفند پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید جمع‌آوری شده و توسط سرم نمکی شستشو داده شدند. ابتدا درصد زنده‌مانی پروتواسکولکس‌ها با استفاده از رنگ ائوزین بررسی شد. جهت انجام مطالعه غلظت‌های مختلف پپتید CM۱۱ (۱۶ µmol، ۶۴ µmol، ۱۲۸ µmol و ۲۵۶ µmol) در کنار گروه کنترل مثبت و منفی در مدت‌زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه بر روی پروتواسکولکس‌ها اثر داده شدند. پس از طی زمان لازم با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین رنگ‌آمیزی انجام و توسط دوربین مجهز به نرم‌افزار Tcapture عکس‌برداری انجام گردید. درنهایت شمارش پروتواسکولکس‌ها از روی عکس توسط نرم‌افزار ImageJ صورت گرفت و درصد زنده و مرده بودن پروتواسکولکس‌ها محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SigmaStat بررسی‌شده و مقادیر P Value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردیدند. تا زمان ۲ ساعت پس از مجاورت پپتید CM۱۱ با پروتواسکولکس‌ها، اثر کلیه‌ی غلظت‌های مورد آزمایش پپتید بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در مقایسه با گروه کنترل منفی فاقد تفاوت معنی‌دار بود. اما پس از ۴ ساعت مجاورت پروتواسکولکس با غلظت‌های ۱۲۸ µmol و ۲۵۶ µmol پپتید CM۱۱، میزان زنده‌مانی پروتواسکولکس‌ها به‌صورت معنی‌دار کاهش یافت (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج طرح حاضر و با توجه به مشکلات موجود در رابطه با عوارض و مقاومت داروهای ضد پروتواسکولکس موجود، پپتید CM۱۱ می‌تواند به‌عنوان یک پپتید نسبتاً مؤثر بر ضد پروتواسکولکس کیست هیداتید در تحقیقات آینده مورداستفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کیست هیداتید، پپتید CM۱۱، پروتواسکولکس، برون تنی

Veterinary Researches & Biological Products No 141 pp: 77-84

Investigation of scolicidal effect of CM11 on Hydatid cyst

By: Fathabadi, A., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Ebrahimzadeh, E., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Borji, H., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. and Komeili, N., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received:2023-03-05 **Accepted: 2023-05-21**

Revised: 2023-05-21 **Published: 2023-12-22**

Emali: eebrahimzade@um.ac.ir

In present study, in order to evaluate scolicidal effect of CM11anti-microbial peptide (α-helical peptide with 11 amino acids) against hydatid cyst, *Echinococcus granulosus* protoscolices were collected and washed with normal saline. At first, the percentage of viability of protoscolices was evaluated using eosin staining. Different concentrations of CM11 peptide (16, 64, 128, and 256 µmol.), along with positive and negative control group, were used against protoscolices for 30, 60, 120 and 240 minutes. Eosin staining was done at the end of the incubation time, and the images were taken with a camera equipped with Tcapture software. Finally, the number of dead and live protoscolices was determined by ImageJ software, and the viability and mortality percent was calculated. Data analysis was carried out by using Sigma Stat (version 3.5). P value < 0.05 was considered statistically significant. Up to 2 hours, the effect of all concentrations of CM11 peptide on protoscolices was not significant compared to the negative control group. However, after 4 hours of exposure, 128 and 256 µm of peptide, were significantly decreased the viability of protoscolices (P<0.05). With regard to the results of this study and considering the resistance of the present antiprotoscolics drugs, the CM11 can be used as a relatively effective peptide against protoscolices in future research.

Keywords: Hydatid cyst, CM11 peptide, *Protoscolex*, Invito assay

مقدمه

کیست هیداتید بیماری مشترک انسان و حیوان است که توسط مرحله نوزادی سستود سگ به نام اکینوکوکوس، متعلق به خانواده تنیده، ایجاد می‌شود. هیداتیدوزیس یکي از بیماري‌هاي بومي کشور هست و بسیاری از حیوانات اهلي از جمله گوسفند، بز، شتر و گاو به‌عنوان میزبانان واسط آن می‌باشند(۲۳). موارد انساني بیماري از استان‌هاي مختلف کشور گزارش شده است(۲۱). راه انتقال بیماری در اثر تماس مستقیم و غیرمستقیم با مدفوع سگ آلوده هست. درمان رایج این بیماری در انسان جراحی همراه دارو درمانی هست و علی‌رغم پیشرفت علم پزشکی هنوز درمان دارویی مؤثر و مناسبی برای این بیماری وجود ندارد(۲۳). همان‌طور که می‌دانیم داروی مؤثر بر روی کیست هیداتید آلبندازول هست که امروزه مشکلاتی از قبیل مقاومت دارویی، سمیت کبدی و عود مجدد بیماری در رابطه با این دارو مطرح هست، لذا تحقیقات به‌منظور دستیابی به داروی جایگزین به طور گسترده در حال انجام می‌باشد.

در سال‌های اخیر مسئله مقاومت‌های دارویي اجرام مختلف ازجمله باکتری‌ها، موجب انجام تحقیقات گسترده به منظور دست‌یابی به داروهای جایگزین شده است. داروهاي ضد انگلي نیز از این امر مستثنی نبوده و مقاومت نسبت به آن‌ها به درجات مختلف ایجاد شده است. اخیراً علاقه‌مندی محققان در زمینه تحقیق در رفع مشکلات ناشی از مقاومت دارویی با استفاده از پپتیدها افزایش چشمگیری داشته است. پپتیدهای ضد میکروبی که به‌اختصار AMP (Antimicrobial Peptide) نامیده می‌شوند در منابع مختلفی مانند گیاهان و حشرات تا مهره‌داران پست و پستانداران شناسایی شده‌اند. بیشتر پپتیدهای شناسایی‌شده پپتیدهای کاتیونی با وزن مولکولی پایین هستند و خصوصیت هیدروفوبیک از خود نشان می‌دهند(۴). یکی از نقش‌های مهم و کلیدی پپتیدهای ضد میکروبی آن است که به‌عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی بدن در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها و حتی سلول‌های سرطان‌زا عمل می‌کنند (۲۵, ۲۷, ۲۸). مطالعه بر روی پپتیدهای ضد میکروبی مؤثر بر روی انگل‌ها در مقایسه با باکتری‌ها بسیار اندک است (۴).

با توجه به احتمال کم بروز مقاومت به این ترکیبات، پپتیدهای ضد میکروبی را می‌توان کاندیدای مناسبی به‌عنوان عوامل ضد باکتریایی و همچنین ضد انگلی در نظر گرفت. در این مطالعه از پپتید کاتیونیک

CM۱۱ (WKLFKKILKVL-NH۲) که پپتیدی کوچک متشکل از یازده اسیدآمینه است، استفاده گردید. این پپتید در دسته پپتیدهای خطی آلفا هلیکال قرار می‌گیرد.

با توجه به مطالعه قبلی درباره اثرات کشندگی پپتید CM۱۱ بر روی تک‌یاخته لیشمانیا ماژور که نشان داد این پپتید اثرات ضدلیشمانیایی قابل‌توجهی دارد (۷) و با توجه به اهمیت بیماری کیست هیداتید، هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات کشندگی این پپتید بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در شرایط آزمایشگاهی (In Vitro) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری پرتواسکولکس‌ها

تعداد ۶ کبد آلوده به کیست هیداتید از گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه صنعتی مشهد جمع‌آوری و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال داده شد. در آزمایشگاه پس از ضدعفونی سطح کیست ها با الکل۷۰٪، مایع و پروتواسکولکس‌های داخل کیست توسط سرنگ۵۰ جمع‌آوری گردید و به ظروف مخروطی انتقال یافت و به مدت ۳۰ دقیقه بدون حرکت قرار داده شد تا پروتواسکولکس‌ها ته‌نشین گردند. پس از ته‌نشین شدن کامل، پروتواسکولکس‌ها، توسط سرم نمکی ۰/۹٪ شستشو داده شدند. شستشو ۳ بار تکرار گردید. بین هر بار شست‌وشو فرصت کافی برای ته‌نشین شدن پروتواسکولکس‌ها داده شد و بعد مایع رویی تخلیه گردید. کلیه‌ی پروتواسکولکس‌ها پس از شستشو در فالکون ۵۰ cc جمع‌آوری و روی آن سرم نمکی ۰/۹٪ ریخته شد و در یخچال نگهداری گردید.

بررسی اثر پپتید CM۱۱ بر روی پروتواسکولکس‌های کیست‌های هیداتید

ساخت و تهیه پپتید CM۱۱ توسط شرکت بیوماتیک کانادا صورت گرفت. پپتید در حلال سرم نمکی ۰/۹٪ حل گردید. پس از دز سنجی در یک مطالعه پایلوت، دزها و گروه‌های آزمایش به شرح زیر انتخاب شدند.

گروه ۱-گروه درمان با پپتید CM۱۱ (غلظت ۱۶ µmol)
گروه ۲-گروه درمان با پپتید CM۱۱ (غلظت ۶۴ µmol)
گروه ۳-گروه درمان با پپتید CM۱۱ (غلظت ۱۲۸ µmol)
گروه۴- گروه درمان با پپتید CM۱۱ (غلظت ۲۵۶ µmol)
گروه۵ - گروه کنترل مثبت (ساولن)
گروه ۶- گروه کنترل منفی(نرمال سالین ۰/۹ ٪)

به منظور انجام تحقیق ابتدا میزان زنده‌مانی (Viability) پروتواسکولکس‌ها با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین ۰/۱ ٪ بررسی شد و در صورتی‌که میزان زنده‌مانی (Viability) حدود ۹۰ ٪ بود جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد. به‌منظور انجام آزمایش ابتدا مایع روی سطح پروتواسکولکس‌ها دور ریخته شد و µl ۱۰ از پروتواسکولکس‌های رسوب‌کرده (۵×۱۰^{۳} تعداد اولیه پروتواسکولکس) برداشت شد و درون میکروتیوب ml ۱/۵ ریخته شد. µl ۱۵۰ پپتید CM۱۱ از هر غلظت مورد نظر بر روی پروتواسکولکس‌های هر میکروتیوب ریخته شد، سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه، ۱۲۰ دقیقه، ۲۴۰ دقیقه قرار داده شد (برای هر زمان میکروتیوب جداگانه از هر غلظت پپتید در نظر گرفته شد). پس از طی زمان مورد نظر میکروتیوب‌ها از انکوباتور خارج و مایع رویی آنها تخلیه، سپس بر روی آنها سرم نمکی ۰/۹٪ ریخته شد. پس از آن سرم نمکی ۰/۹٪ روی پروتواسکولکس‌ها تخلیه و به آن رنگ ائوزین اضافه گردید. پس از طی زمان ۱۰ تا ۱۵ دقیقه از تاثیر رنگ ائوزین، µl ۱۰ از رسوب حاوی پروتواسکولکس‌ها روی لام گسترده شد، بر روی آن لامل قرار داده و با کمک لوپ با درشت نمایی ۳ برابر مشاهده و توسط دوربین مجهز به نرم‌افزار Tcapture عکس‌برداری انجام گردید. درنهایت شمارش کلیه پروتواسکولکس‌ها از روی عکس‌ها و توسط نرم‌افزار Image J انجام گرفت. پروتواسکولکس‌های مرده رنگ قرمز ائوزین را به خود جذب کرده و پروتواسکولکس‌های زنده رنگ را به خود جذب نکردند. تعداد پروتواسکولکس مرده و زنده به تفکیک مورد شمارش قرار گرفت و بر تعداد کل پروتواسکولکس‌ها تقسیم گردید و به این ترتیب درصد پروتواسکولکس‌های مرده(Mortality٪) و زنده (Viability٪) به دست آمد. کلیه آزمایش‌ها ۵ بار تکرار گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا داده‌ها وارد نرم‌افزار Microsoft Excell شد. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار SigmaStat ۳,۵ انجام پذیرفت. پس از انجام آزمون نرمال بودن، چنانچه داده‌ها نرمال بود بین گروه‌ها و در هر گروه در طی زمان از آزمون آماری One-Way ANOVA استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن داده‌ها در این آزمون از تست تکمیلی دانکن (Duncan) استفاده شد. در صورت نرمال نبودن داده‌ها از آزمون آماری غیر پارامتریک Kruskal-Wallis استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن داده‌ها در این آزمون از آزمون Manwithney استفاده شد. مقادیر P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردیدند. جداول برای داده‌های پارامتریک به صورت میانگین ± خطای استاندارد (Mean±SE) و برای داده‌های غیر پارامتریک به صورت میانه و چارک اول و سوم(Median(٪۲۵-٪۷۵) در جدول آورده شد.

نتایج

در این مطالعه غلظت‌های µmol ۱۶، µmol ۶۴، µmol ۱۲۸ و µmol ۲۵۶ از پپتید تهیه گردید و سپس در انکوباتور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی تعداد مشخص پروتواسکولکس به مدت ۳۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه، ۱۲۰ دقیقه، ۲۴۰ دقیقه در کنار کنترل منفی و مثبت قرار داده شد. هر یک از آزمون‌ها حداقل ۵ بار تکرار گردید. نتایج به شرح زیر مشاهده گردید:

پس از ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه: اثر کلیه غلظت‌های مورد آزمایش پپتید بر روی پروتواسکولکس‌های کیست در مقایسه با گروه کنترل منفی فاقد تفاوت معنی‌دار بود (جدول ۱) (نمودار ۱).

پس از ۲۴۰ دقیقه: اثر غلظت‌های ۱۲۸ میکرومول و ۲۵۶ میکرومول پپتید بر روی پروتواسکولکس‌های کیست در مقایسه با گروه کنترل منفی دارای تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). این آزمایش نشان داد غلظت µmol ۱۲۸ پپتید توانسته است پس از ۲۴۰ دقیقه مجاورت پروتواسکولکس‌ها با پپتید میانگین درصد زنده‌مانی را از ۸۵٪ به ۵۸٪ کاهش دهد. همچنین غلظت µmol ۲۵۶ پپتید پس از طی زمان ۲۴۰ دقیقه مجاورت با

پروتواسکولکس‌ها میزان زنده‌مانی را از ۸۵٪ به ۳۲٪ کاهش داد (جدول ۱) (نمودار ۲).

همچنین نمودار ۳ تغییرات درصد زنده‌مانی (viability) پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید را در طول زمان آزمایش در هر گروه نشان می‌دهد. همان‌طور که در این نمودار مشخص است تنها غلظت ۲۵۶ µmol پپتید در زمان ۲۴۰ دقیقه با بقیه زمان‌ها دارای اختلاف معنی‌دار است (نمودار ۳).

بحث

هیداتیوزیس بیماری زئونوزی است که گوشت‌خواران و ازجمله سگ به‌عنوان میزبان نهایی و حیوانات اهلي زيادي ازجمله گوسفند، بز، شتر و گاو به‌عنوان میزبانان واسط آن می‌باشند(۲۳). موارد انساني بيماري نيز از استان‌های مختلف کشور گزارش‌شده است(۲۱). درمان رایج این بیماری در انسان جراحی همراه دارو درمانی می‌باشد(۲۳).

هاشمی‌تبار و همکاران نشان دادند اثر آلبندازول نسبت به مبندازول، در پیشگیري و درمان کیست هیداتید در موش‌های آلوده شده به روش تجربی بیشتر می‌باشد(۱۰). هر چند داروی متداول مورد استفاده بر روی کیست هیداتید، آلبندازول می‌باشد اما امروزه مشکلات زیادی شامل: جذب ضعیف دارو از دستگاه گوارش، مقاومت دارویی، سمیت کبدی و عود کیست پس از استفاده درباره این دارو مطرح می‌باشد. یک آزمایش در شرایط آزمایشگاهی (In Vitro) برای ارزیابی کارایی درمان ترکیبی آلبندازول و اتوواکوئون در برابر کیست‌های هیداتید اولیه در موش‌های آلوده انجام شد و در روش کشت، مدت زمان زنده‌مانی پروتواسکولکس با درمان ترکیبی آلبندازول و اتوواکوئون کوتاهتر از مدت زمان حذف اتوواکوئون به تنهایی در شرایط هوازی بود در نتیجه اتوواکوئون اثر آلبندازول را در درمان کیست هیداتید در موش افزایش داد(۸). در سال‌های اخیر مسئله مقاومت‌های دارويي اجرام مختلف ازجمله باکتری‌ها، موجب انجام تحقیقات گسترده به‌منظور دست‌یابی به داروهای جایگزین شده است. داروهاي ضد انگلي نیز از این امر مستثنی نبوده و مقاومت نسبت به آن‌ها به درجات مختلف ایجاد شده است. یکی از مواردی که به‌عنوان دارو جایگزین مورد توجه محققین هست پپتیدهای ضد میکروبی است (۵, ۶, ۲۴) .

اخیراً به منظور رفع مشکلات ناشی از مقاومت دارویی استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی در تحقیقات افزایش چشمگیری داشته است. در مجموع دو مکانیسم مجزا برای فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی نشان داده شده است گروهی از این پپتیدها مانند درماسپتین(Dermaseptin) و تمپورین (Temporine) باعث تخریب غشا پلاسمایی ارگانیزم هدف می‌شوند و ایجاد حفره در داخل غشا می‌کنند، و گروه دیگر مانند هیستاتین (Histatin) و ایندولیسیدین (Indolicidin) بر اندامک‌های داخل سلول ازجمله میتوکندری اثر منفی برجا می‌گذارند(۴).

با توجه به احتمال کم بروز مقاومت به این ترکیبات، پپتیدهای ضد میکروبی را می‌توان کاندیدای مناسبی به‌عنوان عوامل ضد باکتریایی و همچنین ضد انگلی در نظر گرفت. در این مطالعه از پپتید کاتیونیک CM۱۱(WKLFKKILKVL-NH۲) که پپتیدی کوچک متشکل از یازده اسیدآمینه است، استفاده گردید. این پپتید در دسته پپتیدهای خطی آلفا هلیکال قرار می‌گیرد.

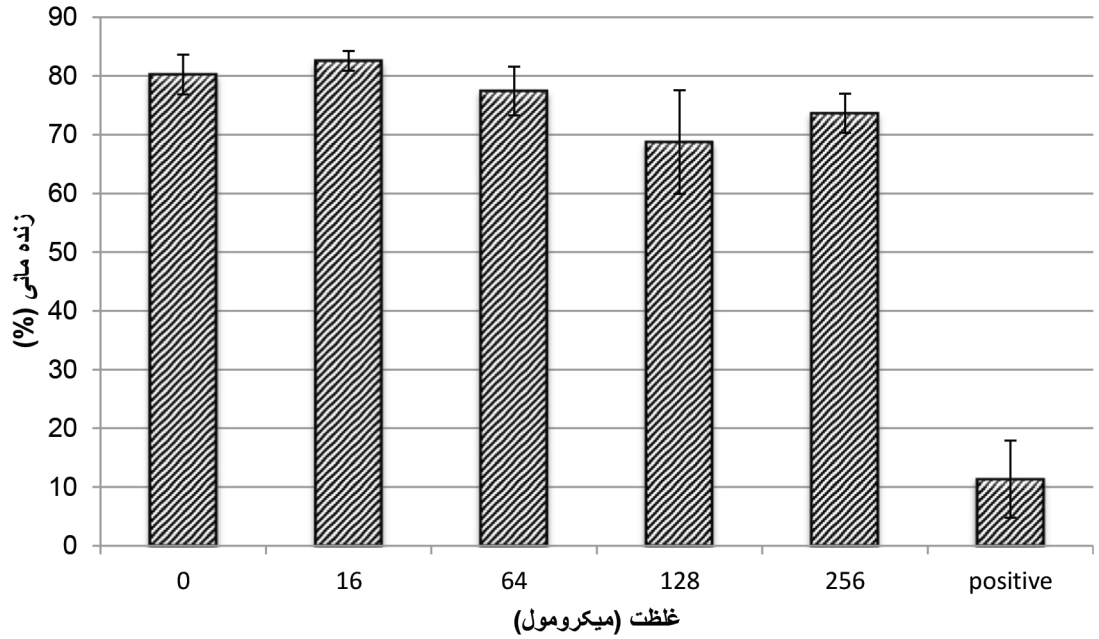
اولین بار اثر ضد میکروبی پپتید CM۱۱ بر روی باکتری بیماری‌زای گیاه که از نظر اقتصادی اهمیت بسیاری داشت مورد بررسی قرار گرفت(۹).

جدول ۱ - اثر غلظت مختلف پپتید ضد میکروبی CM۱۱ بر روی تعداد پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در ۳۰، ۶۰ دقیقه، ۲ و ۴ ساعت پس از مجاورت در شرایط برون تنی.

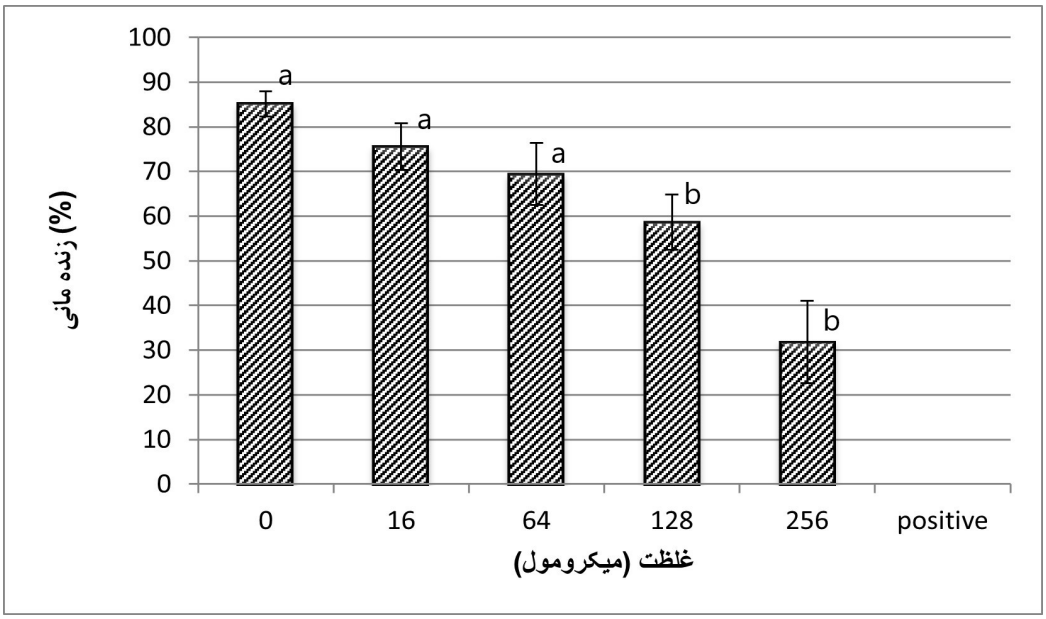
غلظت (µM)	تعداد آزمایش	درصد زنده مانی			
		۳۰ دقیقه (*۱)	۶۰ دقیقه (*۱)	۲ ساعت (*۲)	۴ ساعت (*۲)
		میانه (٪۷۵-٪۲۵)	میانه (٪۷۵-٪۲۵)	میانگین± خطای استاندارد	میانگین± خطای استاندارد
کنترل منفی	۵	(۷۲/۷۸-۶۸/۷۵)۳۷/۷۷	(۹۹/۸۶-۳۴/۸۱) ۸۳/۸۳	۳۸/۳ ±۲۴/۸۰ [a]	۸/۲± ۱/۸۵ [a]
۱۶	۵	(۱۵/۸۶-۰۳/۷۸) ۲۶/۸۴	(۵۲/۸۴-۹۶/۸۳)۵۲/۸۴	۶۸/۱ ± ۵۷/۸۲ [a]	۲۲/۵±۵۴/۷۵ [a]
۶۴	۵	(۷۴/۸۴-۶۸/۷۶) ۲۵/۸۳	(۱۱/۸۳-۰۹/۷۷)۴۶/۷۸	۱۵/۴ ±۴۴/۷۷ [a]	۹/۶±۴/۶۹ [a]
۱۲۸	۵	(۷۸/۸۰-۱۶/۷۴) ۰۶/۷۷	(۱۹/۸۳-۹/۷۴)۹۳/۷۹	۸۲/۸± ۷۵/۶۸ [a]	۱۹/۶±۶/۵۸ [b]
۲۵۶	۵	(۴/۷۷-۹۷/۶۸) ۸۸/۶۹	(۱۴/۷۹-۵۵/۶۵)۳۵/۷۷	۳۳/۳± ۶۵/۷۳ [a]	۱۷/۹±۸/۳۱ [b]
کنترل مثبت	۵	(۸۵/۲۷-۶۸/۵)۹۲/۱۷	(۰۶/۲۳-۰۰/۰)۷۱/۱۸	۵۷/۶±۳۴/۱۱ [b]	۰ [b]

*: تست آماری غیر پارامتریک. *۲: تست آماری پارامتریک.

[ab]: حروف غیر مشابه نشانه اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه کنترل منفی می‌باشد (P<۰/۰۵).



نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های µmol ۱۶،µmol ۶۴، µmol ۱۲۸ و µmol ۲۵۶ پپتید CM۱۱ بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید پس از ۲ ساعت مجاورت با استفاده از روش رنگ‌آمیزی حیاتی. از نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی و ساولن به‌عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد. عدد صفر در نمودار به‌منزله کنترل منفی هست.



نمودار ۲- تأثیر غلظت‌های µmol ۱۶، µmol ۶۴، µmol ۱۲۸ و µmol ۲۵۶ پپتید CM۱۱ بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید پس از ۴ ساعت مجاورت با استفاده از روش رنگ‌آمیزی حیاتی. از نرمال سالین به عنوان کنترل منفی و ساولن به‌عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد. عدد صفر در نمودار به‌منزله کنترل منفی می‌باشد. a b: حروف غیرمشابه نشانه اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه کنترل منفی می‌باشد (P<۰/۰۵).

پس از آن خواص ضد باکتریایی این پپتید بر ضد عفونت‌های بیمارستانی بررسی و ثابت شد(۲, ۳, ۱۸). خواص ضد لیشمانیایی این پپتید نیز توسط خلیلی و همکاران (۲۰۱۹) به اثبات رسیده است (۷).

این پپتید از دو پپتید سکروپین (Cecropins) و ملیتین (Melittin) تشکیل شده است، سکروپین اولین بار از همولنف پروانه ابریشم جدا گردیده است و دارای فعالیت ضد میکروبی وسیعی بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و منفی هست. ملیتین از زهر زنبورعسل اروپایی آپیس ملی فرا جدا گردیده است(۱۸, ۱۹, ۲۶). هر دو پپتید دارای فعالیت گسترده ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی با کمترین اثر توکسیک بر روی سلول‌های پستانداران می‌باشند. پپتید مذکور همانند دیگر پپتیدهای کاتیونیک و آمفی پاتیک این توانایی را دارد که در غشا جرم بیماری‌زا سوراخ ایجاد کند (۱۸).

اثر کشندگی پپتیدهای مختلفی ازجمله سکروپینA (Cecropin A) و ملیتین Melittin۱ (با منشأ حشرات) بر ضد لیشمانیا دونوانی، پپتیدهای نظیر هیستاتین۵ (Histatin ۵ - ۵) و اسکینوپلی پپتید (Skinpolypeptide YY) (با منشأ پستانداران) به ترتیب بر ضد لیشمانیا ماژور و لیشمانیا دونوانی گزارش گردیده است(۴).

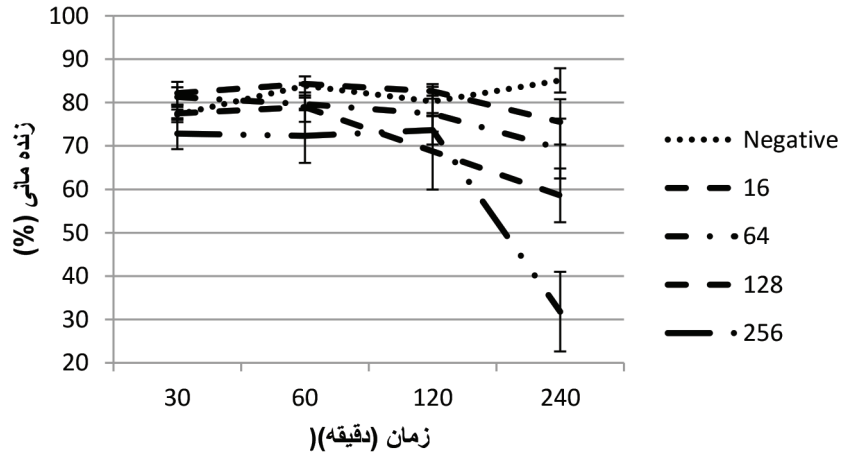
با توجه به تجربه قبلی محقق درباره اثرات کشندگی پپتید CM۱۱ بر روی تک‌یاخته لیشمانیا ماژور که نشان داده شد غلظت µmol ۱۶پپتید اثر ضد لیشمانیایی بارزی داشته است (۷) و با توجه به اهمیت بیماری کیست هیداتید، در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا اثرات کشندگی این پپتید را بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار دهیم.

اثر کشندگی پپتید CM۱۱ بر روی پروتواسکولکس کیست هیداتید در دوزهای µmol ۱۲۸ و µmol ۲۵۶ و در زمان ۲۴۰ دقیقه پس از مجاور شدن مشاهده گردید، که به ترتیب موجب کاهش ۳۰ درصدی و ۵۰ درصدی میانگین درصد زنده‌مانی پروتواسکولکس‌ها شده است. دوز و زمان مورد نیاز برای تاثیر این پپتید در این مطالعه، بسیار بیشتر از دوز و زمان مورد نیاز برای تأثیر این پپتید بر روی تک‌یاخته‌هایی مانند leishmania بوده است، که با توجه به تک‌یاخته بودن لیشمانیا این امر قابل انتظار بود.

تاکنون اثر ترکیبات گیاهی مختلفی بر روی کیست هیداتید در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی بررسی شده است. از جمله این ترکیبات گیاهی می‌توان به عصاره الکلی سیر (Allium sativum) و عصاره متانولی گیاه جغجغه (Prosopis farcta)، آویشن شیرازی (Zataria multiflora)، نعنا(Mentha)، سیاه‌دانه (Nigella sativa)، زرشک (Berberis vulgaris) و زنیان (Ajowan) اشاره کرد. این ترکیبات دارای اثر کشندگی قابل قبول بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید بوده‌اند(۱۳-۱۷, ۲۰, ۲۲).

بررسی اثر پپتیدهای ضد میکروبی (AMP) جدا شده از زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس (Mesobuthus eupeus) با کروماتوگرافی تبادل یونی و جداسازی فراکشن‌های سمی بر روی *Echinococcus granulosus* انجام شد و نشان داده شد که زهر عقرب می‌تواند به عنوان یک پروتواسکولکس کش مفید واقع گردد(۱۱). همچنین در مطالعه‌ای مشابه اثر مهاری پپتیدهای ضد میکروبی جدا شده از زهر عقرب کژدم سیاه (Androctonus crassicauda) بر روی پروتواسکولکس‌های *Echinococcus granulosus* و اثر ضدقارچی و باکتریایی انجام شد(۱). با وجوداین تحقیقات محدودی در رابطه با اثرات این ترکیبات بر روی سایر انگل‌ها انجام شده است.

لاندا و همکاران (۲۰۰۹) پپتیدهای تمپورین A و ۳۶۷-IB را در شرایط برون‌تنی بر روی سیستی سرکوس‌های *Taenia crassiceps* اثر دادند.



نمودار ۳- تأثیر غلظت‌های µmol ۱۶، µmol ۶۴، µmol ۱۲۸ و µmol ۲۵۶ پپتید CM۱۱ بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه، ۱۲۰ دقیقه و ۲۴۰ دقیقه پس از مجاورت با استفاده از روش رنگ‌آمیزی حیاتی. از نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی و ساولن به‌عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد.

سپس به کمک میکروسکوپ اینورت و میکروسکوپ الکترونیک به بررسی تغییرات ساختاری پروتواسکولکس‌ها پرداختند. آن‌ها فاکتورهایی چون حرکت، اندازه و درصد evagination پروتواسکولکس‌ها در مجاورت صفرا ۱٪ و محیط کشت RPMI را مورد بررسی قراردادند. دز (gr/ml) ۲۰۰ و (gr/ml) ۴۰۰ این پپتیدها باعث تشکیل ماکروویزیکول در زمان ۳ تا ۶ ساعت پس از در معرض قرار گرفتن گردید که این اثرات تا ۲۴ ساعت بعد در دید میکروسکوپ نوری واضح‌تر شد. آن‌ها پپتید IB-۳۶۷ را مؤثرتر دانستند(۱۲).

در تنها تحقیق انجام شده توسط لاندا و همکاران (۲۰۰۹)، دوز استفاده شده دو پپتید تمپورین A و IB-۳۶۷ بر روی سیستی سرک‌های *T. crassiceps* ۲۰۰ و ۴۰۰ گرم بر میلی‌لیتر عنوان شده است که دز ۴۰۰ گرم بر میلی‌لیتر ۲۴ ساعت پس از تأثیر تمپورین A موجب کاهش ۲۰ ٪ و IB-۳۶۷ موجب کاهش۴۰ درصدی میزان evagination پروتواسکولکس‌ها شدند. همچنین در تزریق این دو پپتید به موش تمپورین A و IB-۳۶۷ به ترتیب موجب کاهش ۵۰ ٪ و ۲۵ ٪ لود انگل شدند. دز موثر در تحقیق حاضر به دز مورداستفاده در تحقیق لاندا و همکاران (۲۰۰۹) نزدیک است هرچند به دلیل متفاوت بودن روش آزمایش امکان مقایسه نتایج وجود ندارد(۱۲).

تغییرات درصد زنده‌مانی (viability) پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در مجاورت غلظت µmol ۲۵۶ پپتید نشان داد زمان ۲۴۰ دقیقه (۴ ساعت) زمان مناسب اثر پپتید است. این زمان با زمان استفاده شده در تحقیق لاندا و همکاران (۲۰۰۹) که بازه ۳ تا ۶ ساعت را مورد بررسی قراردادند همخوانی دارد.

استفاده از پپتیدها به‌عنوان کاندید دارویی به دلیل مشخص بودن نوع ماده مؤثر بر اجرام، در مقایسه با عصاره‌های گیاهی که خود متشکل از چندین ماده می‌باشند قابلیت کنترل بیشتری دارد. هرچند در حال حاضر هزینه ساخت این پپتیدها بالا است، لذا استفاده هم‌زمان از پپتید و داروهای ضد کیست هیداتید مانند آلبندازول می‌تواند با ایجاد حساسیت در لایه خارجی پروتواسکولکس توسط پپتید باعث کاهش دوز مصرفی داروی اصلی و درنتیجه کاهش عوارض جانبی داروی اصلی درمان کیست هیداتید گردد

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد پپتید CM۱۱ در مقایسه با گروه کنترل منفی فعالیت کشندگی ضد پروتواسکولکس در شرایط آزمایشگاهی را دارد. با توجه به نتایج طرح حاضر و با توجه به مشکلات موجود در رابطه با عوارض و مقاومت داروهای موجود، پپتید CM۱۱ می‌تواند به‌عنوان یک پپتید نسبتاً مؤثر بر ضد پروتواسکولکس کیست هیداتید در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار گیرد. بدیهی است در تحقیقات آینده بایستی بهبود زمان و دز مؤثر این پپتید مدنظر باشد. احتمال دارد استفاده هم‌زمان این پپتید با سایر ترکیبات مؤثر بر روی پروتواسکولکس و تغییرات ساختاری در پپتید کاهش دز مصرفی و زمان اثر پپتید را به همراه داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج پایان نامه دکترای عمومي دامپزشكي می‌باشد و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از حمایت مالی و پژوهشی معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

1- Al-Malki, E. S. and N. Abdelsater. 2020. In vitro Scolicidal effects of Androctonus crassicauda (Olivier, 1807) venom against the protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27: 1760-1765.

2- Amani, J., K. A Barjini, M. M Moghaddam and A. Asadi. 2015. In vitro synergistic effect of the CM11 antimicrobial peptide in combination with common antibiotics against clinical isolates of six species of multidrug-resistant pathogenic bacteria. *Protein and peptide letters* 22: 940-951.

3- Azad, M. B., A. M. Abou-Setta, B. F. Chauhan, R. Rabbani, J. Lys, L. Copstein, A. Mann, M. M. Jeyaraman, A. E. Reid and M. Fiander. 2017. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Cmaj* 189: E929-E939.

4- Cobb, S. L. and P. W. Denny. 2010. Antimicrobial peptides for leishmaniasis. *Current opinion in investigational drugs* 11: 868-875.

5- Dey, A. R., N. Begum, M. A. Alim and M. Z. Alam. Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh. *Parasitology international* 77: 102105.

6- Ebrahimi, R., M. Yakhchali and H. Malekinejad. 2020. Anthelmintic resistance to Albendazole and Fenbendazole in gastrointestinal nematodes of sheep in Saghez Municipality, Iran. *Journal of Veterinary Research* 75(1):1-7.

7- Ebrahimzade, E., M. Mohebali, P. Shayan, S. Mohammadi-Yeganeh, M. M. Moghaddam, S. Elikaee, B. Akhoundi and M. K. Sharifi-Yazdi. 2019. Investigation of the antimicrobial activity of a short cationic peptide against promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MHRO/IR/75/ER): An in vitro study. *Experimental parasitology* 196: 48-54.

8- Enkai, S., H. Kouguchi, D. K. Inaoka, T. Irie, K. Yagi and K. Kita. 2021. In vivo efficacy of combination therapy with albendazole and atovaquone against primary hydatid cysts in mice. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 40: 1815-1820.

9- Ferre, R., E. Badosa, L. Feliu, M. Planas, E. Montesinos and E. Bardají. 2006. Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3302-3308.

10- HashemiTabar , Razmi.GR and Maleki.M. 2009. In vivo effect of albendazole and mebendazole on hydatid cyst of mice. *Archives of Razi Institute* 64: 45-50.

11- Jafari. H, Nemati. M, Haddad Molayan, Khaleghi. P, Rostamkolaie.L and H. Nejat.H. 2019. Scolicidal activity of Mesobuthus eupeus venom against the protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Archives of Razi Institute* 74: 183-189.

12- Landa, A., L. Jiménez, K. Willms, L. F. Jiménez-García, R. Lara-Martínez, L. Robert, O. Cirioni, W. Barańska–Rybak and W. Kamysz. 2009. Antimicrobial peptides (Temporin A and Iseganan IB-367): Effect on the cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Molecular and biochemical parasitology* 164: 126-130.

13- Maggiore, M. A., A. A. Albanese, L. B. Gende, M. J. Eguaras, G. M. Denegri and M. C. Elissondo. 2012. Anthelmintic effect of Mentha spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitology research* 110: 1103-1112.

14- Mahmoudvand, H., A. Asadi, M. F. Harandi, F. Sharififar, S. Jahanbakhsh and E. S. Dezaki. 2014. In vitro lethal effects of various extracts of Nigella sativa seed on hydatid cyst protoscoleces. *Iranian journal of basic medical sciences* 17: 1001.

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

16- Moazeni, M. and A. Nazer. 2010. In vitro effectiveness of garlic (Allium sativum) extract on scolices of hydatid cyst. *World journal of surgery* 34: 2677-2681.

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

18- Moghaddam, M. M., F. Abolhassani, H. Babavalian, R. Mirnejad, K. Azizi Barjini and J. Amani. 2012. Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*. *Probiotics and antimicrobial proteins* 4: 133-139.

19- Morré, D. J., E. Sun, C. Geilen, L.-Y. Wu, R. De Cabo, K. Krasagakis, C. Orfanos and D. Morre. 1996. Capsaicin inhibits plasma membrane NADH oxidase and growth of human and mouse melanoma lines. *European Journal of Cancer* 32: 1995-2003.

20- Namaei, M. H., R. Solgi and A. Tavakoli Kareshk. 2022. Prosopis farcta Extract Potentiates the Scolicidal Activity Against Protoscolices of Hydatid Cysts. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: *Biological Sciences*: 1-6.

21- Rokni, M. 2009. Echinococcosis/hydatidosis in Iran. *Iranian J Parasitol* 4: 1-16.

22- Rouhani, S., N. Salehi, M. Kamalinejad and F. Zayeri. 2013. Efficacy of Berberis vulgaris aqueous extract on viability of Echinococcus granulosus protoscolices. *Journal of Investigative Surgery* 26: 347-351.

23- Sayek, I., M. B. Tirnaksiz and R. Dogan. 2004. Cystic hydatid disease: current trends in diagnosis and management. *Surgery today* 34: 987-996.

24- Sazmand, A., G. Alipoor, S. Zafari, S. M. Zolhavarieh, A. D. Alanazi and N. D. Sargison. 2020. Assessment of knowledge, attitudes and practices relating to parasitic diseases and anthelmintic resistance among livestock farmers in Hamedan, Iran. *Frontiers in veterinary science* 7: 584323.

25- Slocinska, M., P. Marciniak and G. Rosinski. 2008. Insects antiviral and anticancer peptides: new leads for the future Protein and peptide letters 15: 578-585.

26- Tamang, D. G. and M. H. Saier Jr. 2006. The cecropin superfamily of toxic peptides. *Microbial Physiology* 11: 94-103.

27- Thevissen, K., H.-H. Kristensen, B. P. Thomma, B. P. Cammue and I. E. Francois. 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug discovery today* 12: 966-971.

28- Zhang, L. and T. J. Falla. 2009. Host defense peptides for use as potential therapeutics. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000) 10: 164-171.