



بررسی اثر محلول متیلن بلو در از بین بردن پروتو اسکولکس های کیست هیداتیک در شرایط آزمایشگاهی

خسرو حضرتی تپه^{*}، سید جواد موسوی^۲، افшин برازش^۳، الماس اسدی^۴

^۱ گروه انگلشناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۲ گروه جراحی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۳ گروه میکروب شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۴ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

چکیده

زمینه: در حال حاضر درمان انتخابی کیست هیداتیک جراحی می‌باشد. با توجه به خطر ریخته شدن محتویات کیست به داخل اعضای شکم و انتشار اسکولکس‌ها حین خارج‌سازی، جهت پیشگیری، مواد اسکولکس‌کش مختلفی به داخل کیست تزریق می‌شود که عوارض جانبی گوناگونی در بدن میزان داردند. لذا در این تحقیق تأثیر اسکولکس‌کشی متیلن بلو بر روی کیست هیداتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: جهت انجام مطالعه، تعداد ۵۰ کبد آلوده گوسفند که حاوی حداقل یک کیست باور با پروتواسکولکس‌های زنده بودند، جمع‌آوری گردید. زنده بودن پروتواسکولکس‌ها از طریق حرکت سلول‌های شعله شمعی و تکان‌های محتویات داخلی آنها و در نهایت رنگ‌آمیزی ائوزین تأیید شد و در سه گروه به ترتیب تحت تأثیر سالین هیپرتونیک اشباع، نرمال سالین و متیلن‌بلو به عنوان کتترل‌های مثبت، منفی و تست قرار گرفتند. پروتواسکولکس‌ها در زمان‌های ۲، ۴، ۸ و ۱۶ دقیقه از نظر زنده بودن در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

پافعه‌ها: متیلن‌بلو و سالین نرمال در فواصل زمانی مذکور هیچ‌گونه تأثیری بر اسکولکس‌ها نداشتند و صد درصد پروتواسکولکس‌ها تا پایان ۱۶ دقیقه زنده بودند، ولی سالین هیپرتونیک اشباع در زمان‌های ۲ و ۴ دقیقه، حدود ۹۵ درصد و ۸ و ۱۶ دقیقه، ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌ها را از بین برداشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده حاکی از عدم تأثیر این ماده بر روی پروتواسکولکس‌ها بود و لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات و تحقیقات بیشتر در زمینه دستیابی به یک ماده اسکولکس‌کش مؤثر و بدون عوارض برای انسان ادامه یابد.

واژگان کلیدی: متیلن‌بلو، پروتواسکولکس، کیست هیداتیک، شرایط آزمایشگاهی، اکینوکوکوس گرانولوزوس

دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۸ - پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۲۱

آدرس: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو پردیس نازلو، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

Email :xhazrati@yahoo.com

مقدمه

در حفره پری سیست یا بافت‌های مجاور باقی مانده، و ایجاد کیست‌های جدید را بنمایند (۹) و یا عوارضی مانند کلائزیت و تنگی مجاری صفرا به همراه داشته باشند (۱۰)، طوری که در یک مطالعه میزان عود کیست‌های هیداتیک بعد از اعمال جراحی، حدود ۱۳ درصد گزارش شده است (۱۱). جراحان برای جلوگیری از عود یا کاهش احتمال آن، هنگام برداشت کیست در اتاق عمل، مواد اسکولکس‌کشی را به داخل کیست هیداتیک تزریق می‌کنند.

تاکنون اسکولکس‌کش‌های زیادی بکار گرفته شده‌اند. موادی چون فرمالین ۲ درصد، سرم نمکی هیپرتونیک ۲۰-۳۰ درصد، الكل ۹۶ درصد، محلول ستريمايد اسکولیسايد، نیترات نقره و بتادین را می‌توان به این منظور نام برد (۱۲). هر کدام از این مواد دارای معایب و محاسنی هستند که کاربرد آنها را محدود می‌نماید. فرمالین اولین و رایج‌ترین ماده مورد استفاده بود. علی‌رغم اثر بخشی مؤثر آن به علت سمی بودن دیگر استفاده نمی‌شود، چون هنگام تزریق به درون کیست‌های هیداتیک کبدی، امکان دارد از طریق راه‌های ارتباطی که بین حفره کیست و مجاری صفراء و وجود دارد وارد این مجاری شده و بنایه ماهیت سوزاننده خود، بالقوه به اپی‌تیلوم داخل مجاری، آسیب وارد ساخته و باعث ایجاد فیروز و تنگی مجاری گردد (۱۳). سرم نمکی هیپرتونیک ۲۰-۳۰ درصد به عنوان مواد اسکولکس‌کش در اتاق‌های عمل بخش‌های جراحی از گذشته تا به امروز مورد استفاده قرار می‌گیرد. دلیل استفاده از این ماده به این خاطر است که باعث ایجاد خاصیت اسموزی قوی در جداره پروتواسکولکس‌ها شده و در نهایت موجب متلاشی شدن آنها می‌شود. ولی عیب آن این است که غلظت

هیداتیدوزیس یا اکینوکوکوزیس بیماری انگلی ناشی از ابتلاء به مرحله لاروی (کیست هیداتیک) انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس می‌باشد (۱ و ۲). این بیماری از جمله بیماری‌های مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی بوده که سالیانه خسارات اقتصادی و بهداشتی سنگینی به کشورهای مختلف جهان از جمله ایران وارد می‌سازد (۳). در یک مطالعه مروی، وضعیت آلدگی کیست هیداتیک در ایران در طی یک دوره بیست ساله، از سال ۱۳۶۴ تا ۱۳۸۴، جمع‌بندی شده و نتایج در سه محور گزارشات موردی، اعمال جراحی انجام شده در بیمارستان‌ها و مطالعات سرولوژی گزارش گردیده است. تعداد گزارشات موردی از بیماری هیداتیدوزیس در بافت‌های غیر معمول بدن انسان، ۴۵ مورد بوده و میزان تقریبی آلدگی در کشور، ۴/۸ عمل جراحی در صد هزار جمعیت در سال برآورد شده است. همچنین این مطالعه، میانگین آلدگی بر اساس گردآوری نتایج سرولوژی انجام شده در این مدت بیست ساله را حدود ۴/۴۲ درصد اعلام نموده است (۴).

پاره شدن کیست‌های هیداتیک بارور در بدن معمولاً منجر به تشکیل کیست‌های ثانویه در اعضای دیگر شده و اغلب به شوک آنافیلاکسی و مرگ منجر می‌شود (۵). با توجه به خطرات بیماری و عدم وجود دارویی موثر، در حال حاضر بهترین راه درمان این بیماری جراحی است (۶ و ۷)، اما شرایط جسمانی خاص و یا وجود ضایعات متعدد در اعضاء مختلف برخی بیماران، باعث محدودیت این نوع درمان در افراد مذکور می‌گردد (۸). هنگام خارج نمودن و تخلیه کیست توسط جراح، امکان دارد که مقداری از پروتواسکولکس‌های زنده در اثر نشت مایع داخل آن،

با و بدون رنگ‌آمیزی با ائوزین به عنوان معیار برای تعیین مرگ اسکولکس‌ها استفاده گردید. روش اول، بر مبنای مشاهده حرکت سلول‌های شعله شمعی و حرکت و تکان‌های محتويات داخلی پروتواسکولکس‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 10$ و در روش دوم که با استفاده از رنگ‌آمیزی پروتواسکولکس‌ها با ائوزین بود، هر پروتواسکولکس‌کش که رنگ ائوزین را جذب کرد، مرده در نظر گرفته شد. تعداد پروتواسکولکس‌ها به میزان هزار پروتواسکولکس در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید و در سه گروه از لوله‌های آزمایش ریخته شد. به لوله‌های گروه اول، سرم فیزیولوژی (کترل منفی)، لوله‌های گروه دوم نمک هیپertonیک اشباع (کترل مثبت) و گروه سوم محلول متیلن‌بلو pH برابر با ۷ و غلظت 0.3 درصد (۱۸) اضافه گردید. از تمامی لوله‌های آزمایش و گروه‌های کترل در طی زمان‌های ۲ و ۴ و ۸ و ۱۶ دقیقه اسمیر مستقیم تهیه و در میدان‌های مختلف میکروسکوپی با بزرگنمایی $\times 10$ تعداد پروتواسکولکس‌ها شمارش شده و از نظر زنده بودن به صورت درصد مشخص می‌شدند. از دست دادن شکل بیضوی و تغییر شکل گرد پروتواسکولکس‌ها، جمع شدن روستلوم‌ها و گرفتن رنگ ائوزین به منزله مرده بودن آنها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همان‌طور که در جدول ۱ آمده است، در فاصله زمانی ۴۰ دقیقه در گروه کترل مثبت تحت اثر با سالین هیپertonیک اشباع، ۹۵ درصد پروتواسکولکس‌ها از بین رفتند و در گروه کترل منفی تحت اثر با سرم فیزیولوژی، ۱۰۰ درصد آنها زنده ماندند و بالاخره در گروه مورد مطالعه، محلول متیلن‌بلو هیچ‌گونه تأثیری بر اسکولکس‌ها مشاهده نشد (جدول ۱).

آن در ۳۰ درصد باقی نمی‌ماند و در نتیجه حل شدن در مایع هیدراتیک، رقیق و کم و یا بی‌اثر می‌شود. از طرفی هم اگر غاظت در این حد باقی بماند، نسوج سالم اطراف را تخریب می‌کند (۱۴). در مورد ماده بتادین، عدم تأثیر آن به عنوان یک ماده ضد اسکولکس به اثبات رسیده است (۱۵).

در این مطالعه اثر متیلن‌بلو به عنوان یک اسکولکس کش مورد آزمایش قرار گرفته است. متیلن‌بلو علاوه‌بر اینکه عوارض جانبی سویی ندارد، از نظر ارزان بودن و قابل دسترس بودن و همچنین رنگی بودن آن، جراح می‌تواند انتشار آن را در نقاط مختلف بدن در حین عمل جراحی، به سادگی بررسی نماید (۱۶).

مواد و روش کار

این مطالعه برای بار اول در سال ۱۳۸۰ به صورت تجربه اولیه و به طور کامل در سال ۱۳۸۵ انجام گردید. جهت انجام تحقیق، ابتدا در دفعات متعدد به کشتارگاه صنعتی ارومیه مراجعه و تعداد ۵۰ کبد گوسفند آلوه به کیست هیدراتیک شناسایی و جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انتقال داده شدند. کیست‌ها از نظر بارور و غیر بارور بودن مورد بررسی قرار گرفته و مایع کیست‌های بارور آسپیره شد و در لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید.

لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه جهت تهشیش شدن سر لاروها ثابت نگه داشته شدند، سپس بخش رویی لوله‌ها با پیپت پاستور تخلیه و مایع تهشیش شده از نظر تعداد و درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها بررسی شد. از آن جایی که فعالیت سلول‌های شعله‌شمعی قبل از جذب رنگ از بین می‌رود (۱۷)، به همین دلیل از دو روش مشاهده با میکروسکوپ نوری

جدول ۱) مقایسه میانگین اثر پروتواسکولکس کشی متیلن‌بلو با نمک هیپرتونیک اشباع و نرمال سالین زمان ۲ و ۴ دقیقه

متیلن‌بلو	نمک هیپرتونیک اشباع	نرمال سالین	Candidacy Interval*
اسکولکس کش	اسکولکس کشته شده	اسکولکس کشته شده	تعداد
پس از ۴ دقیقه	پس از ۲ دقیقه	تعداد	میانگین تعداد
.	.	.	.
۹۰/۳۱ حد بالا حد پایین ۹۰/۶۸	۲/۱۹	۱۵/۵۵	۹۵
.	.	.	.

فرمایین ۱۰ دقیقه می‌باشد (۱۹). این ماده بر روی کیست‌های دختر حتی بعد از گذشت ۴ روز اثری ندارد و در گزارش پژوهشگران آمده است که موجب اسکلروز مجاری صفوایی و یا حتی مرگ به علت مسمومیت می‌شود (۲۰). از سرم نمکی هیپرتونیک ۲۰-۳۰ درصد سال‌ها در ایران استفاده شده و نتایج رضایت‌بخشی داشته است و علت اینکه برخی از این محلول استفاده نمی‌کنند این است که غلظت آن در حد ۳۰ درصد باقی نمی‌ماند و در نتیجه حل شدن در مایع هیداتیک، رقیق و کم و یا بی‌اثر می‌شود و اگر هم غلظتش در این حد باقی بماند، به نسوج سالم اطراف ضایعه، آسیب می‌رساند (۲۱). از طرفی این ماده به عنوان یک ماده اسکولکس کش در غلظت‌های مختلف از ۰/۹ تا ۳۰ درصد و با زمان‌های مختلف از یک تا ۶۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفته است، فقط اعلام نکرداند که در غلظت‌های مشخص چند درصد از پروتواسکولکس‌ها و در چه زمانی زنده هستند (۱۷).

الکل ۹۶ درصد و آب اکسیژنه ۱۲ حجم را نیز به عنوان اسکولکس کش بکار می‌برند (۲۲ و ۲۳). داروی دیگر مورد استفاده برای این منظور، محلول نیم درصد نیترات نقره با اثر کشنده بر روی اسکولکس‌ها می‌باشد. این محلول باید تازه و با آب مقطر تهیه و مصرف شود (۲۴). مواردی از مرگ متعاقب مصرف

اثر اسکولکس کشی متیلن‌بلو و سالین هیپرتونیک اشباع و سرم فیزیولوژی در فواصل زمانی ۸ و ۱۶ دقیقه هم مورد بررسی قرار گرفت که در طی این مدت، همچنان متیلن‌بلو بدون اثر، سالین هیپرتونیک ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌ها از بین برد و سالین نرمال هیچ‌گونه اثری روی پرتو اسکولکس‌ها نداشت.

بحث

هنگام خارج‌سازی و تخلیه کیست هیداتیک توسط جراح، در صورت نشتمایع آن در بافت‌های اطراف، احتمال ایجاد کیست‌های جدید و عود بیماری وجود دارد (۹). بنابراین برای جلوگیری از این امر و یا کاهش احتمال آن، هنگام برداشت کیست در اتاق عمل، مواد اسکولکس کش توسط جراح به داخل کیست هیداتیک تزریق می‌شود. تاکنون مواد زیادی به عنوان اسکولکس کش به کار گرفته شده‌اند (۱۲). برخی از این مواد، توانایی مؤثر در از بین بردن پروتواسکولکس‌ها را دارند؛ ولی به خاطر عوارض سوء مصرف آن‌ها بر روی سایر اعضاء بدن، امکان استفاده از آنها محدودتر می‌گردد.

از گذشته‌های بسیار دور محلول فرمایین ۲ درصد را برای سترون کردن کیست به کار می‌برند. مدت اثر

میزبان باشد، و از طرفی دیگر برای اثبات تأثیر مثبت یا منفی متیلنبلو و حصول یک نتیجه قابل اعتماد که در مطالعه نهایی حق پناه و همکاران بی اثر بیان شده بود (۲۶)، این دارو انتخاب گردید. محدودیت‌های موجود در طرح حاضر، پیدا کردن کیست هیداتیک بارور انسانی و حیوانی بود. نتایج به دست آمده بیانگر عدم تأثیر این ماده بر روی پروتواسکولکس‌ها بوده و با نتیجه مطالعه انجام شده در اصفهان هم خوانی دارد (۲۶).

در مطالعات دیگری که در رابطه با تأثیر آلبندازول بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک انجام گردیده و جواب‌های متفاوتی اخذ شده است (۸ و ۲۸)، می‌توان اختلاف بین سویه‌ای در پروتواسکولکس‌های انگل را عامل این امر دانست. ولی در مورد متیلنبلو، این ماده یک رنگ حیاتی بوده و فاقد اثرات سمی و یا عوارض عمدی دیگر بر روی سلول‌های میزبان می‌باشد. حتی در مواردی از جمله متهموگلوبولینمی و پادزه ر سیانید، به صورت تزریق وریدی در انسان استفاده می‌شود (۲۸).

نظر به اهمیت بیماری هیداتیدوزیس در ایران و از آنجایی که متیلنبلو تأثیری بر کشته شدن پروتواسکولکس‌های انگلی ندارد، پیشنهاد می‌شود مطالعات و تحقیقات بیشتر در زمینه دستیابی به یک ماده اسکولکس‌کش قوی و بدون عوارض برای انسان ادامه یابد.

References:

- Thompson RCA. Biology and Systematics of Echinococcus. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. *Echinococcus and hydatid disease*. Oxon: CAB International, 1995; 1-50.
- Schantz P M. Parasitic zoonoses in perspective. *Int J Parasitol* 1991; 21: 161-70.
- Torgerson PR, Dowling PM, Abo-Shehada MN. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis. Part 3: Jordan, a developing country with lower-middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95: 595-603.
- Yousofi H. Situation of hydatid cyst infection during last two decades (1985-2005) in Iran (Review of articles). *J Shahrekord Univ Med Sci* 2008; 10: 78-88.
- Schipper HG, Kager PA. Diagnosis and treatment of unilocular hydatid disease (Echinococcus granulosus infection). *Ned Tijdschr Geneesk* 1997; 141: 984-9.
- Ramos G, Orduna A, Garcia-Yuste M, et al. Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. *World J Surg* 2001; 25: 46-57.

این محلول در کیست‌های ریه و کبد از ایران گزارش شده و علت احتمالی آن، استفاده از نمک‌های محلول در آب ذکر شده است که می‌توانند نیترات نقره را به عنصری سمی تبدیل کنند (۱۲). بتادین هم به عنوان یک اسکولکس‌کش توسط جراحان مورد استفاده قرار گرفته است و باعث شد که تحقیقی هم در مورد پروتواسکولکس‌کشی این ماده صورت پذیرد و عدم تأثیر بتادین به عنوان یک ماده اسکولوسیدال به اثبات رسید (۱۵ و ۲۵).

در تحقیقی که در رابطه با خاصیت اسکولکس‌کشی متیلنبلو بر روی کیست هیداتیک کبد گوسفند در دانشگاه اصفهان طی دو مرحله مقدماتی و نهایی انجام شده، میانگین تعداد اسکولکس‌های کشته شده، حدود ۳/۷۵ درصد و در مرحله مقدماتی همین مطالعه، حدود ۵۰ درصد اعلام گردیده است (۹) که مؤلف، عامل اختلاف موجود بین نتایج مطالعه مقدماتی و طرح اصلی خود را انجام این پژوهش‌ها در دو فصل متفاوت از سال (فصل سرد و گرم)، فاکتور pH، احتمال تفاوت بین نوع گوسفندان و اختلاف در سویه‌های پروتواسکولکس‌های این دو پروژه، ذکر کرده‌اند (۲۶). در مطالعه حاضر از یک طرف برای دستیابی به یک ماده اسکولکس‌کش که بر روی عملکرد فیزیولوژی و بیوشیمیایی انگل تأثیر گذاشته و فاقد اثرات بیوشیمیایی و عوارض جانبی بر روی

7. Alizadeh S A, Kalantari M, Ahrari Kh. A case report on the interaperitoneal rupture of liver Hydatid cyst due to the accident. *J Arak Univ Med Sci* 2009; 12: 111-5.
8. Jamshidi M, Mohraz M, Zanganeh M, et al. Combination therapy of albendazole and praziquantel in treatment of hydatid cyst. *Med Sci J Islamic Azad Univ* 2007; 3: 157-60.
9. Barros JIU. Hydatid disease of the liver. *AM J Surg* 1987; 135: 597-600
10. GhasemiKhah R, Dalimi Asl AH, Hashemi Malayeri B. The lethal effect of low voltage of direct electrical current on the Hydatid cyst Protoscoleces. Rahavard Danesh, *J Arak Univ Med Sci* 2003; 23: 32-8.
11. Jamali R, Ahmadi KH, Mahami M, et al. Prevalence of relapse hidatidos in patients of Tabriz hospitals. The National Congress on Hydatid Cyst. 2007 May. 9-10, Yasuj, Iran.
12. Eyüpoglu B, Doğanay M, Reis E, et al. The effects of scolicidal agents on hepatopancreaticobiliary system "An experimenal study". *Turkish J Gastroenterol* 1999; 10: 280-6.
13. Belghiti J, Benhamou JP, Houry S, et al. Caustic sclerosing cholangitis. A complication of the surgical treatment of hydatid disease of the liver. *Arch Surg* 1986; 121: 1162-5.
14. Saidi F. Surgery of Hydatid Disease, 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1976, 112-21.
15. Jalayer T, Rezazade A. Effects of Butadiene on Hydatid cyst Scolexes. *J Isfahan Med Sch* 1985; 12: 904-13.
16. Koelzow H, Gedney JA, Baumann J, et al. The effect of methylene blue on the hemodynamic changes during ischemia reperfusion injury in orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg* 2002; 94: 824-9.
17. Kayaalp C, Balkan M, Aydin C, et al. Hypertonic saline in hydatid disease. *World J Surg* 2001; 25: 975-9.
18. Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic microbiology. 8th ed. NewYork: Mosby, 1990, 171-86.
19. Dew, H. Operative treatment of hydatid cysts of the liver surgery. *Gynaecol Obstet* 1992; 2: 239-44.
20. Davidson LR. Hydatid cysts of the lung. *Am J Surg* 1955; 89: 1042-53.
21. Pelaez V, Kugler C, del Carpio M, et al. Treatment of hepatic hydatid cysts by percutaneous aspiration and hypertonic saline injection: results of a cooperative work. *Bol Chil Parasitol* 1999; 54: 63-9.
22. Giorgio A, Tarantino L, Francica G, et al. Unilocular hydatid liver cysts: treatment with US-guided, double percutaneous aspiration and alcohol injection. *Radiology* 1992; 184: 705-10.
23. Landa Garcia JI, Alonso E, Gonzalez-Uriarte J, et al. Evaluation of scolicidal agents in an experimental hydatid disease model. *Eur Surg Res* 1997; 29: 202-8.
24. Dilsiz A, Acikgozoglu S, Gunel E, et al. Ultrasound-guided percutaneous drainage in the treatment of children with hepatic hydatid disease. *Pediatr Radiol* 1997; 27: 230-3.
25. Jalayer T, Askari I. A study of the effect of aqueous iodine on hydatid cysts in vitro and in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 1966; 60: 169-71.
26. Haghpanah B, Ghayur Z, Dolatshahi K. In vitro study of Scolicidal effect of Methylen Blue in Hydatid cyst of liver sheep. *J Res Med Sci* 1998; 1: 28-31.
27. Hazrati Tappeh KH, Aghazadeh J, Musavi SJ. Study of effects of Albendazole Sulfoxide on obviation of *Echinococcus granulosus* protoscolexes. *Urmia Med J* 2008; 19: 180-1.
28. Behdad A, Memari MR, Ghasemi AA, et al. Methylen blue usage in diagnosis of extent of traumatic necrotizing liver injury. *Feyz J Kashan Univ Med Sci* 2006; 10: 7-10.