



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

خسرو حضرتی تپه^{۱*}، سید جواد موسوی^۲، افشین برازش^۳، الماس اسدی^۴

^۱ گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

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

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

^۴ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

چکیده

زمینه: در حال حاضر درمان انتخابی کیست هیداتیک جراحی می باشد. با توجه به خطر ریخته شدن محتویات کیست به داخل اعضای شکم و انتشار اسکولکس ها حین خارج سازی، جهت پیشگیری، مواد اسکولکس کش مختلفی به داخل کیست تزریق می شود که عوارض جانبی گوناگونی در بدن میزبان دارند. لذا در این تحقیق تأثیر اسکولکس کشی متیلن بلو بر روی کیست هیداتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: جهت انجام مطالعه، تعداد ۵۰ کبد آلوده گوسفند که حاوی حداقل یک کیست بارور با پروتواسکولکس های زنده بودند، جمع آوری گردید. زنده بودن پروتواسکولکس ها از طریق حرکت سلول های شعله شمعی و تکان های محتویات داخلی آنها و در نهایت رنگ آمیزی اتوزین تأیید شد و در سه گروه به ترتیب تحت تأثیر سالین هیپرتونیک اشباع، نرمال سالین و متیلن بلو به عنوان کنترل های مثبت، منفی و تست قرار گرفتند. پروتواسکولکس ها در زمان های ۲، ۴، ۸ و ۱۶ دقیقه از نظر زنده بودن در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

یافته ها: متیلن بلو و سالین نرمال در فواصل زمانی مذکور هیچ گونه تأثیری بر اسکولکس ها نداشتند و صد در صد پروتواسکولکس ها تا پایان ۱۶ دقیقه زنده بودند، ولی سالین هیپرتونیک اشباع در زمان های ۲ و ۴ دقیقه، حدود ۹۵ درصد و ۸ و ۱۶ دقیقه، ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها را از بین برد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده حاکی از عدم تأثیر این ماده بر روی پروتواسکولکس ها بود و لذا پیشنهاد می شود مطالعات و تحقیقات بیشتر در زمینه دستیابی به یک ماده اسکولکس کش مؤثر و بدون عوارض برای انسان ادامه یابد.

واژگان کلیدی: متیلن بلو، پروتواسکولکس، کیست هیداتیک، شرایط آزمایشگاهی، اکتینوکوکوس گرانولوزوس

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

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

Email: xhazrati@yahoo.com

مقدمه

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

پاره شدن کیست های هیداتیک بارور در بدن معمولاً منجر به تشکیل کیست های ثانویه در اعضای دیگر شده و اغلب به شوک آنافیلاکسی و مرگ منجر می شود (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 اعضا مختلف برخی بیماران، باعث محدودیت این نوع درمان در افراد مذکور می گردد (۸). هنگام خارج نمودن و تخلیه کیست توسط جراح، امکان دارد که مقداری از پروتواسکولکس های زنده در اثر نشت مایع داخل آن،

در حفره پری سیست یا بافت های مجاور باقی مانده، و ایجاد کیست های جدید را بنمایند (۹) و یا عوارضی مانند کلانژیت و تنگی مجاری صفرا به همراه داشته باشند (۱۰)، طوری که در یک مطالعه میزان عود کیست های 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 اسکولکس کشی را به داخل کیست هیداتیک تزریق می کنند.

تاکنون اسکولکس کش های زیادی بکار گرفته شده اند. موادی چون فرمالین ۲ درصد، سرم نمکی هیپرتونیک ۳۰-۲۰ درصد، الکل ۹۶ درصد، محلول ستریماید اسکولیساید، نیترا ت نقره و بتادین را می توان به این منظور نام برد (۱۲). هر کدام از این مواد دارای معایب و محاسنی هستند که کاربرد آنها را محدود می نماید. فرمالین اولین و رایج ترین ماده مورد استفاده بود. علی رغم اثر بخشی مؤثر آن به علت سمی بودن دیگر استفاده نمی شود، چون هنگام تزریق به درون کیست های هیداتیک کبدی، امکان دارد از طریق راه های ارتباطی که بین حفره کیست و مجاری صفراوی وجود دارد وارد این مجاری شده و بنابه ماهیت سوزاننده خود، بالقوه به اپی تلیوم داخل مجاری، آسیب وارد ساخته و باعث ایجاد فیروز و تنگی مجاری گردد (۱۳). سرم نمکی هیپرتونیک ۳۰-۲۰ درصد به عنوان مواد اسکولکس کش در اتاق های عمل بخش های جراحی از گذشته تا به امروز مورد استفاده قرار می گیرد. دلیل استفاده از این ماده به این خاطر است که باعث ایجاد خاصیت اسموزی قوی در جداره پروتواسکولکس ها شده و در نهایت موجب متلاشی شدن آنها می شود. ولی عیب آن این است که غلظت

آن در ۳۰ درصد باقی نمی ماند و در نتیجه حل شدن در مایع هیداتیک، رقیق و کم و یا بی اثر می شود. از طرفی هم اگر غلظت در این حد باقی بماند، نسوج سالم اطراف را تخریب می کند (۱۴). در مورد ماده بتادین، عدم تأثیر آن به عنوان یک ماده ضد اسکولکس به اثبات رسیده است (۱۵).

در این مطالعه اثر متیلن بلو به عنوان یک اسکولکس کش مورد آزمایش قرار گرفته است. متیلن بلو علاوه بر اینکه عوارض جانبی سویی ندارد، از نظر ارزان بودن و قابل دسترس بودن و همچنین رنگی بودن آن، جراح می تواند 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 آلوده به کیست هیداتیک شناسایی و جمع آوری گردید و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انتقال داده شدند. کیست ها از نظر بارور و غیر بارور بودن مورد بررسی قرار گرفته و مایع کیست های بارور آسپیره شد و در لوله های ۱۵ میلی لیتری جمع آوری گردید.

لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه جهت ته نشین شدن سر لاروها ثابت نگه داشته شدند، سپس بخش رویی لوله ها با پیت پاستور تخلیه و مایع ته نشین شده از نظر تعداد و درصد زنده بودن پروتواسکولکس ها بررسی شد. از آن جایی که فعالیت سلول های شعله شمعی قبل از جذب رنگ از بین می رود (۱۷)، به همین دلیل از دو روش مشاهده با میکروسکوپ نوری

با و بدون رنگ آمیزی با اتوزین به عنوان معیار برای تعیین مرگ اسکولکس ها استفاده گردید. روش اول، بر مبنای مشاهده حرکت سلول های شعله شمعی و حرکت و تکان های محتویات داخلی پروتواسکولکس ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی $10\times$ و در روش دوم که با استفاده از رنگ آمیزی پروتواسکولکس ها با اتوزین بود، هر پروتواسکولکسی که رنگ اتوزین را جذب کرد، مرده در نظر گرفته شد.

تعداد پروتواسکولکس ها به میزان هزار پروتواسکولکس در هر میلی لیتر تنظیم گردید و در سه گروه از لوله های آزمایش ریخته شد. به لوله های گروه اول، سرم فیزیولوژی (کنترل منفی)، لوله های گروه دوم نمک هیپرتونیک اشباع (کنترل مثبت) و گروه سوم محلول متیلن بلو pH برابر با ۷ و غلظت ۰/۳ درصد (۱۸) اضافه گردید. از تمامی لوله های آزمایش و گروه های کنترل در طی زمان های ۲ و ۴ و ۸ و ۱۶ دقیقه اسمیر مستقیم تهیه و در میدان های مختلف میکروسکوپی با بزرگنمایی $10\times$ تعداد پروتواسکولکس ها شمارش شده و از نظر زنده بودن به صورت درصد مشخص می شدند. از دست دادن شکل بیضوی و تغییر شکل گرد پروتواسکولکس ها، جمع شدن روستلوم ها و گرفتن رنگ اتوزین به منزله مرده بودن آنها در نظر گرفته شد.

یافته ها

همان طور که در جدول ۱ آمده است، در فاصله زمانی ۲ و ۴ دقیقه در گروه کنترل مثبت تحت اثر با سالین هیپرتونیک اشباع، ۹۵ درصد پروتواسکولکس ها از بین رفتند و در گروه کنترل منفی تحت اثر با سرم فیزیولوژی، ۱۰۰ درصد آنها زنده ماندند و بالاخره در گروه مورد مطالعه، محلول متیلن بلو هیچ گونه تأثیری بر اسکولکس ها مشاهده نشد (جدول ۱).

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

اسکولکس کش	تعداد	تعداد	میانگین تعداد	SD	SE	CI*
	اسکولکس کشته شده	اسکولکس کشته شده	اسکولکس کشته شده	(انحراف معیار)	(خطای معیار)	% 95
متیلن بلو	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نمک هیپرتونیک اشباع	۹۰	۱۰۰	۹۵	۱۵/۵۵	۲/۱۹	۹۹/۳۱ حد بالا ۹۰/۶۸ حد پایین
نرمال سالین	۰	۰	۰	۲/۱۹	۰	۰

Candidacy Interval*

اثر اسکولکس کشی متیلن بلو 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 متیلن بلو بدون اثر، سالین هیپرتونیک ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها را از بین برد و سالین نرمال هیچ گونه اثری روی پروتواسکولکس ها نداشت.

بحث

هنگام خارج سازی و تخلیه کیست هیداتیک توسط جراح، در صورت نشت مایع آن در بافت های اطراف، احتمال ایجاد کیست های 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 می شود. تاکنون مواد زیادی به عنوان اسکولکس کش به کار گرفته شده اند (۱۲). برخی از این مواد، توانایی مؤثر در از بین بردن پروتواسکولکس ها را دارند؛ ولی به خاطر عوارض سوء مصرف آن ها بر روی سایر اعضای بدن، امکان استفاده از آنها محدودتر می گردد.

از گذشته های بسیار دور محلول فرمالین ۲ درصد را برای سترون کردن کیست به کار می بردند. مدت اثر

فرمالین ۱۰ دقیقه می باشد (۱۹). این ماده بر روی کیست های دختر حتی بعد از گذشت ۴ روز اثری ندارد و در گزارش پژوهشگران آمده است که موجب اسکروز مجاری صفراوی و یا حتی مرگ به علت مسمومیت می شود (۲۰). از سرم نمکی هیپرتونیک ۳۰-۲۰ درصد سال ها در ایران استفاده شده و نتایج رضایت بخشی داشته است و علت اینکه برخی از این محلول استفاده نمی کنند این است که غلظت آن در حد ۳۰ درصد باقی نمی ماند و در نتیجه حل شدن در مایع هیداتیک، رقیق و کم و یا بی اثر می شود و اگر هم غلظتش در این حد باقی بماند، به نسوج سالم اطراف ضایعه، آسیب می رساند (۲۱). از طرفی این ماده به عنوان یک ماده اسکولکس کش در غلظت های مختلف از ۹/۰ تا ۳۰ درصد و با زمان های مختلف از یک تا ۶۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفته است، فقط اعلام نکرده اند که در غلظت های مشخص چند درصد از پروتواسکولکس ها و در چه زمانی زنده هستند (۱۷).

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

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 بی‌اثر 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 هم‌خوانی 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 عمده دیگر بر روی سلول‌های میزبان می‌باشد. حتی در مواردی از جمله مت‌هموگلوبولینمی و پادزهر سیانید، به‌صورت 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.

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 نیترا ت نقره را به عنصری سمی تبدیل کنند (۱۲). بتادین هم به‌عنوان 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 به‌عنوان 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

References:

1. Thompson RCA. Biology and Systematics of Echinococcus. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. Echinococcus and hydatid disease. Oxon: CAB International, 1995, 1-50.
2. Schantz P M. Parasitic zoonoses in perspective. Int J Parasitol 1991; 21: 161-70.
3. Torgerson PR, Dowling PM, Abo-Shehadeh 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.
4. 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.
5. Schipper HG, Kager PA. Diagnosis and treatment of unilocular hydatid disease (Echinococcus granulosus infection). Ned Tijdschr Geneesk 1997; 141: 984-9.
6. Ramos G, Orduna A, Garcia-Yuste M, et al. Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. World J Surg 2001; 25: 46-57.

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 Uuniv 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. Eyüpoğlu B, Doğanay M, Reis E, et al. The effects of scolocidal 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 scolicial agents in an experimental hydatid disease model. *Eur Surg Res* 1997; 29: 202-8.
24. Dilsiz A, Acikgozoglul 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. Haghpahan B, Ghayur Z, Dolatshahi K. In vitro study of Scolocidal 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 protoscoleces. *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.