

(OPEN ACCESS)

In Vitro Evaluation of Blood and Water Enriched with *Lactobacillus plantarum* on the Anticancer Properties and Protein Concentrations of Saliva in Iranian Medicinal Leech (*Hirudo orientalis*)

Saeed Safavipour^{*1}, Niloufar Parchami²

1. Corresponding Author, Ph.D. in Animal and Poultry Nutrition, Member of the Young Researchers and Elites Club of Iran, Islamic Azad University of Isfahan, Iran. E-mail: s.safavipour@iau.ir
2. M.Sc. in Biotechnology, University of Isfahan, Iran. E-mail: niloofer.parchami@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: The Iranian medicinal leech (<i>Hirudo orientalis</i>), an animal with high muscle contractility, has the ability to store blood in the stratum corneum, and after concentrating the blood, produces saliva rich in therapeutic enzymes. These enzymes play an important role in the treatment of diseases and have a history of several hundred years in traditional Iranian medicine, including the works of Abu Ali Sina, such as the Qanun. Medicinal leeches synthesize more than 100 salivary proteins and peptides to swallow and digest blood. These molecules are secreted during feeding and target physiological pathways involved in host defense and act as analgesics (kinins), anticoagulants (hirudin, choline, saratin, and apyrase), anti-inflammatory (eglin, badelins, and trypsin inhibitors), cell matrix-degrading proteins (hyaluronidase), or antimicrobials. Unfavorable conditions of the digestive tract of leeches collected in the wild or farmed leeches with improper nutrition can sometimes affect their beneficial microbial population and reduce the amount and concentration of saliva produced, which is the main goal of leech growth and reproduction. The present study was conducted to evaluate the effects of consuming the probiotic <i>Lactobacillus plantarum</i> in two environments of water and blood consumed by leeches and to examine its results on the saliva of Iranian medical leeches.
Article history: Received: 07.16.2025 Revised: 07.26.2025 Accepted: 08.13.2025	
Keywords: Anticancer activity, <i>Hirudo orientalis</i> , Iranian medicinal leech, <i>Lactobacillus plantarum</i> , Leech saliva proteins, Probiotics	
	Materials and Methods: In this study, the effect of feeding leeches with the probiotic <i>Lactobacillus plantarum</i> with different concentrations of 10^4 , 10^6 , 10^8 CFU/ml and a control group without any concentration of The bacterium in the blood and water environment was investigated. The experiments were conducted with seven treatments and five replications and a completely randomized statistical design and in laboratory conditions. Saliva was extracted using menthol after 12 weeks of starvation (quarantine without food) on leeches and was examined by MTT test (to measure anticancer activity) and Bradford test (to measure protein).
	Results: The study showed a significant increase in the protein concentration of the saliva of the medicinal leech <i>Orientalis</i> in treatments

containing 108 CFU/mL that used the aforementioned bacteria ($P < 0.05$). Also, the saliva of leeches fed with high concentrations through blood showed the greatest effect of inhibiting the growth of MCF-7 cancer cells. In general, it can be stated that the probiotic improved the therapeutic quality of the saliva of cultured leeches.

Conclusion: Increased salivation in medical leeches is a natural response to the type of leech feeding, caused by the presence of bioactive substances in their saliva. This saliva contains a combination of compounds helping leech nutrition and facilitating its therapeutic effects. Therefore, adding the probiotic *Lactobacillus plantarum* to the leeches' diet significantly improves the quality of the saliva produced (increasing the concentration of active proteins) and increases its anticancer properties. This could be an effective step in improving the effectiveness of farmed leeches in medical treatments.

Cite this article: Safavipour, Saeed, Parchami, Niloufar. 2026. In Vitro Evaluation of Blood and Water Enriched with *Lactobacillus plantarum* on the Anticancer Properties and Protein Concentrations of Saliva in Iranian Medicinal Leech (*Hirudo orientalis*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (2), 159-170.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2025.23884.1968

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی اثر آب و خون غنی‌شده با *Lactobacillus plantarum* بر ویژگی‌های ضدسرطانی و غلظت پروتئین‌های بزاق زالوی طبی ایرانی (*Hirudo orientalis*) در شرایط آزمایشگاهی

سعید صفوی‌پور^{۱*}، نیلوفر پرچی^۲

۱. نویسنده مسئول، دکتری تغذیه دام و طیور، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ایران، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

رایانامه: s.safavipour@iau.ir

۲. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان، ایران. رایانامه: niiloofar.parchami@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: سابقه و هدف: زالوی طبی ایرانی (<i>Hirudo orientalis</i>)؛ جانوری با قابلیت انقباض عضلانی بالا، توانایی ذخیره خون در چینه‌دان را داراست و پس از تغلیظ خون، بزاقی سرشار از آنزیم‌های درمانی تولید می‌کند. این آنزیم‌ها نقش مهمی در درمان بیماری‌ها دارند و پیشینه‌ای چندصدساله در طب سنتی ایران دارند، از جمله در آثار ابوعلی سینا مثل قانون یافت شده است. زالوهای طبی برای بلعیدن و هضم خون، بیش از ۱۰۰ پروتئین و پپتید بزاقی سنتز می‌کنند. این مولکول‌ها در طول تغذیه ترشح می‌شوند و مسیرهای فیزیولوژیکی دخیل در دفاع میزبان را هدف قرار می‌دهند و به عنوان مسکن (کینیناز)، ضد انعقاد (هیرودین، کالین، ساراتین و آپیراز)، ضد التهاب (اگلین‌ها، بدلین‌ها و مهارکننده تریپتاز)، پروتئین‌های تجزیه‌کننده ماتریکس سلولی (هیالورونیداز) یا ضد میکروب عمل می‌کنند. شرایط نامطلوب دستگاه گوارش زالوهای جمع‌آوری شده در طبیعت یا زالوهای پرورشی با تغذیه ناصحیح در مزارع گاهاً می‌تواند بر روی جمعیت میکروبی مفید آن‌ها تأثیر بگذارد و میزان، غلظت بزاق تولیدی که هدف اصلی پرورش و تکثیر زالو است را کاهش دهد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (<i>Lactobacillus plantarum</i>) در دو محیط آب و خون مصرفی زالو و بررسی نتایج آن بر بزاق زالوی طبی ایرانی صورت گرفت.	تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۵ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۲ واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک‌ها، پروتئین‌های بزاق زالو، زالوی طبی ایرانی، فعالیت ضد سرطانی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، <i>Hirudo orientalis</i>

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، اثر تغذیه زالوها با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) با غلظت‌های متفاوت 10^4 ، 10^6 ، 10^8 CFU/ml و گروه شاهد بدون هیچ غلظتی از باکتری در محیط خون و آب بررسی شد. آزمایش‌ها با هفت تیمار و پنج تکرار و طرح آماری کاملاً تصادفی و در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. بزاق پس از ۱۲ هفته

اعمال گرسنگی (قرنطینه بدون غذا) به زالوها با استفاده از منتول استخراج شد و با آزمون MTT (برای سنجش فعالیت ضدسرطانی) و آزمون بردفورد (برای اندازه‌گیری پروتئین) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با بررسی انجام شده، افزایش معنی‌دار غلظت پروتئین بزاق زالوی طبی اورینتالیس در تیمارهای حاوی 10^4 CFU/mL که باکتری مذکور را استفاده کرده بودند، نشان داد ($P < 0.05$) هم‌چنین بزاق زالوهای تغذیه‌شده با غلظت بالا از طریق خون، بیش‌ترین اثر مهار رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 را نشان داد و در کل می‌توان چنین بیان نمود که پروبیوتیک باعث بهبود کیفیت درمانی بزاق زالوهای پرورشی شد.

نتیجه‌گیری: افزایش بزاق در زالوهای طبی یک پاسخ طبیعی به نوع تغذیه زالو است که به دلیل وجود مواد فعال زیستی در بزاق آن‌ها ایجاد می‌شود. این بزاق حاوی ترکیبی از ترکیبات است که به تغذیه زالو کمک کرده و اثرات درمانی آن را تسهیل می‌کند. بنابراین افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به رژیم تغذیه زالوها به شکل معنی‌داری باعث ارتقاء کیفیت بزاق تولیدی (افزایش غلظت پروتئین‌های فعال) و افزایش خواص ضدسرطانی آن می‌شود. این امر می‌تواند گامی مؤثر در بهبود اثربخشی زالوهای پرورشی در درمان‌های پزشکی باشد.

استناد: صفوی‌پور، سعید، پرچمی، نیلوفر (۱۴۰۵). بررسی اثر آب و خون غنی‌شده با *Lactobacillus plantarum* بر ویژگی‌های ضدسرطانی و غلظت پروتئین‌های بزاق زالوی طبی ایرانی (*Hirudo orientalis*) در شرایط آزمایشگاهی. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۵ (۲)، ۱۷۰-۱۵۹.

Doi: 10.22069/japu.2025.23884.1968



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

امروزه بیش از ۶۵۰ گونه زالو شناسایی شده است، اما تنها ۱۵ گونه از آن‌ها در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از قرن‌ها پیش در سراسر دنیا به‌خصوص در اروپا و آمریکا زالوهایی که با عنوان زالوی طبی شناخته می‌شوند، در درمان بیماران به کاربرده شده‌اند (۱). هیروود اوریتالیس گونه مقاوم به خشکی است و هم‌چنین آب‌های زلال و سرد محل مناسبی برای زندگی این گونه است. از این‌رو در قسمت‌هایی از آسیای میانه، قفقاز و ایران یافت می‌شود. گونه هیروود اوریتالیس همان‌طور که گفته شد از جمله گونه‌های درمانی بومی ایران است و ظاهری شبیه به گونه زالوی ایرانی (*Hirudo orientalis*) دارد. هم در قسمت شکمی و هم در قسمت پشتی این گونه خطوط و لکه‌هایی قابل مشاهده است که خاص این گونه هستند (۲). زالوها برای تغذیه از خون تازه مهره‌داران بهره می‌گیرند که از طریق گزش و مکش حاصل می‌شود (۳). برای انجام تغذیه مستمر، زالو بزاق خود را به خون میزبان وارد می‌کند. این بزاق از غدد بزاقی ترشح می‌شود که بین حلق و دیواره بدن قرار دارند و از بافت اپیدرمی تغییر یافته‌اند؛ غددی تک‌سلولی با ساختاری مشابه گلابی که از طریق مجراهایی به زیر آرواره‌ها می‌رسند (۴). بزاق زالو حاوی مولکول‌های زیستی فعال از جمله انواع پروتئین‌های با خواص بی‌حس‌کنندگی، اتساع عروقی، ضد انعقادی، ضد التهابی و آنتی‌بیوتیکی است. مطالعات تجربی نشان داده‌اند که تزریق وریدی بزاق زالو به حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند متاستاز و کلونی‌سازی سلول‌های سرطانی ریه را مهار کند (۵). خواص ضد انعقادی و ضد درد پروتئین‌های بزاق عمدتاً از طریق مهار آنزیم‌های خانواده سرین پروتئاز اعمال می‌شوند که به جلوگیری از شناسایی نیش زالو توسط میزبان کمک می‌کنند (۶).

دو مولکول کلیدی، کلرومایستین (*Chloramayctin*) و دستابیلاز (*Dastabilaz*)، در بزاق زالو دارای فعالیت ضد میکروبی هستند. *Destabilase* با فعالیت β -گلیکوزیدازی خود، پیوندهای β 1-4 در دیواره پپتیدوگلیکان باکتری‌ها را تجزیه کرده و عملکردی مشابه آنزیم لیزوزیم بزاق انسان دارد (۷). این فعالیت‌ها هم به آنزیم‌های خاص و هم به اجزای غیرآنزیمی مانند پپتیدهای ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها وابسته‌اند و بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* تأثیرگذارند (۸). ویژگی‌های ضد انعقاد و وجود پروتئین‌های اختصاصی بزاق زالو، آن را به گزینه‌ای مؤثر در جلوگیری از تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی تبدیل کرده‌اند. تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده مستقیم از زالو در محل توده‌های سرطانی موجب کاهش درد بیماران شده است (۹). پروتئین سلول‌های سرطان ریه را داراست (۱۰). سایر ترکیبات بزاق مانند آنزیم *Hyaluronidase* نیز با تخریب CD44-هیالورونیک اسید، نقش ضد توموری دارند (۱۱). برخی مطالعات اثر ترکیبی بزاق زالو با داروهای ضدسرطان مانند ایرینوتکان و کربوپلاتین را بررسی کرده‌اند. یافته‌ها نشان دادند که این ترکیب‌ها موجب افزایش اثر درمانی داروها از طریق تعاملات آنزیمی، بهبود جذب یا کاهش مقاومت دارویی می‌شوند (۱۲). پژوهش‌های اخیر از استفاده لیپوزومی برای انتقال بزاق زالو خبر داده‌اند، که موجب افزایش اثر ضدتکثیر بزاق بر سلول‌های MCF-7 سرطان پستان شده‌اند (۱۳). با این حال، هیچ گزارشی از بهینه‌سازی بزاق زالوهای پرورشی از طریق تغذیه با پروبیوتیک‌های خون تاکنون منتشر نشده است. به‌ویژه در مورد گونه‌های بومی ایران، مطالعات کاربردی اندک است.

بنابراین، بررسی نقش پروبیوتیک‌ها در ارتقای کیفیت بزاق زالوهای پرورشی می‌تواند در توسعه درمان‌های پزشکی و تولید دارویی نقش‌آفرین باشد. هدف این پژوهش، تحلیل خواص ضدسرطانی بزاق زالو و بهینه‌سازی تولید آن در مزارع تکثیر زالو بوده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در تابستان ۱۴۰۰ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان انجام شد. تعداد ۳۵ زالوی آرایشی گونه بومی *Hirudo orientalis* با قرنطینه شش‌ماهه، از طریق گروه دانش‌بنیان صنعت زالوی ایران خریداری و در قالب هفت تیمار با پنج تکرار مورد بررسی قرار گرفتند.

شرایط و نحوه نگهداری از زالوها در شرایط آزمایشگاهی: زالوها در ظروف پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتری با پنج زالو در هر ظرف نگهداری شدند. برای تهویه و جلوگیری از فرار، درب ظروف با تور و کش بسته شد. دمای محیط و آب بسته به مرحله تغذیه زالوها تنظیم شد:

- پیش از تغذیه: ۲۵ درجه سانتی‌گراد
- پس از تغذیه: کاهش تدریجی روزانه تا رسیدن به ۱۸ درجه

تعویض آب با توجه به مرحله زیستی زالوها به‌صورت روزانه، یک روز در میان، یا هر سه تا چهار روز انجام شد. پس از تغذیه، زالوها به مدت یک ماه در دمای کنترل‌شده نگهداری شدند تا به مرحله گرسنگی برسند (۶).

تهیه خون استریل و فرمول‌بندی تغذیه: خون بهداشتی از شرکت فناور زیست‌دانه ایرانیان (برند زلوک) تهیه شد. برای تغذیه، نمونه‌های خون با سه غلظت 10^8 CFU/ml، 10^6 CFU/ml و 10^4 CFU/ml از *Lactobacillus plantarum* باکتری پروبیوتیک

ترکیب شدند. هم‌چنین گروه‌های شاهد و تغذیه پوستی نیز لحاظ شدند. هر زالو با وزن ۰/۲۵ گرم حدود ۱ میلی‌لیتر خون مصرف کرد و میزان خون برای پنج زالو در هر تیمار آماده گردید

آماده‌سازی باکتری و محیط کشت: باکتری *L. plantarum* با کد ATCC:13643 از انستیتو پاستور تهیه و در محیط MRS جامد و مایع کشت داده شد. پس از گرماگذاری، با استفاده از طیف‌سنج و رقت‌سازی، سه غلظت هدف تهیه گردید. برای ذخیره طولانی‌مدت، استوک با گلیسرول تهیه و در دمای منفی ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۴).

روش تغذیه زالوها: از روش غیرمستقیم تغذیه با استفاده از دستکش لاتکس حاوی خون گرم‌شده (۳۸ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. دمای محیط آبی زالوها ۲۵ درجه سانتی‌گراد حفظ گردید. بعد از تغذیه، زالوها به ظروف جدید منتقل و در انکوباتور نگهداری شدند. تعویض آب با توجه به میزان دفع و آلودگی کنترل شد و دما به تدریج تا ۱۸ درجه کاهش یافت (۱۵).

استخراج بزاق زالو به روش نوآورانه متول: پس از ۱۲ هفته گرسنگی، زالوهای گونه *Hirudo orientalis* با حفظ شرایط دمایی یکسان، آماده استخراج بزاق شدند. در این پژوهش، برخلاف روش شکوری و همکاران (۲۰۱۸) که از اتانول استفاده کرده بودند، برای نخستین‌بار از متول (مشتق دارویی گیاه نعنای فلفلی) به‌عنوان روشی زیست‌سازگار و مقرون به‌صرفه برای استخراج بزاق زالو استفاده شد. در این روش پس از ۱۲ هفته گرسنگی، بزاق زالوها با روشی نوآورانه با استفاده از متول استخراج شد:

مراحل استخراج بزاق:

۱. تهیه محلول منتول: ۵۰ میلی‌گرم منتول در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل شد.
۲. قرار دادن زالوها در محلول منتول به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه.
۳. انتقال زالوها به بشر حاوی سالین (۵ میلی‌لیتر) و سپس سدیم کلراید.
۴. جمع‌آوری محلول بزاقی در فالكون ۴۵ میلی‌لیتری.
۵. سانتریفیوژ محلول بزاق در ۹۰۰۰ rpm و دمای 4°C به مدت ۱۰ دقیقه.
۶. فیلتراسیون سوپرناتانت با فیلتر $0.45\ \mu\text{m}$ و انتقال به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری.
۷. خشک‌سازی نمونه با دستگاه Freeze Dryer.
۸. نگهداری بزاق خشک‌شده در فریزر -80°C درجه سلسیوس و نمونه تازه جهت آزمون بردفورد در 4°C (۶).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های بزاق با استفاده از آزمون بردفورد: معرف بردفورد با کوماسی بلو G-250، اتانول و اسید فسفریک تهیه شد و پس از صاف‌سازی، در شرایط تاریک و دمای 4°C نگهداری گردید. برای رسم منحنی استاندارد، از آلبومین گاوی (BSA) با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر استفاده شد. نمونه‌ها در ظروف الایزا ریخته شدند و بعد از افزودن معرف، در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شدند. غلظت نهایی پروتئین‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید (۱۶).

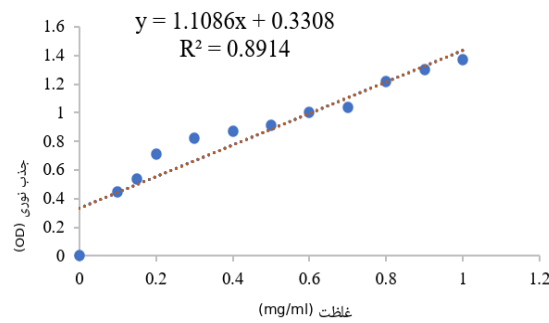
بررسی اثر آزمون MTT برای اثر ضدسرطانی بزاق

مراحل انجام آزمون:

۱. سلول‌های MCF-7 (سرطان پستان انسانی) و L929 (فیبروبلاست موش) از منابع معتبر تهیه شدند.
۲. محیط کشت DMEM با گلوکز بالا و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی برای رشد سلول‌ها استفاده شد.
۳. بزاق زالو در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ mg/mL آماده شد.
۴. سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت شدند و پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT، ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای 37°C قرار گرفتند.
۵. فورمازان ایجادشده با محلول DMSO حل شده و جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه گردید (۱۷). داده‌ها با SPSS v.26 تحلیل و اختلاف‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ بررسی شدند.

نتایج

رسم منحنی استاندارد بردفورد برای زالو: برای تعیین غلظت پروتئین‌های بزاق زالو، نمودار استاندارد براساس جذب نوری محلول‌های مختلف آلبومین گاوی (BSA) در غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/میکرولیتر رسم شد. از نرم‌افزار اکسل برای محاسبه معادله خط استفاده گردید. سپس با جای‌گذاری مقدار جذب نوری نمونه‌ها در معادله خط، غلظت پروتئین‌ها (X) محاسبه شد.



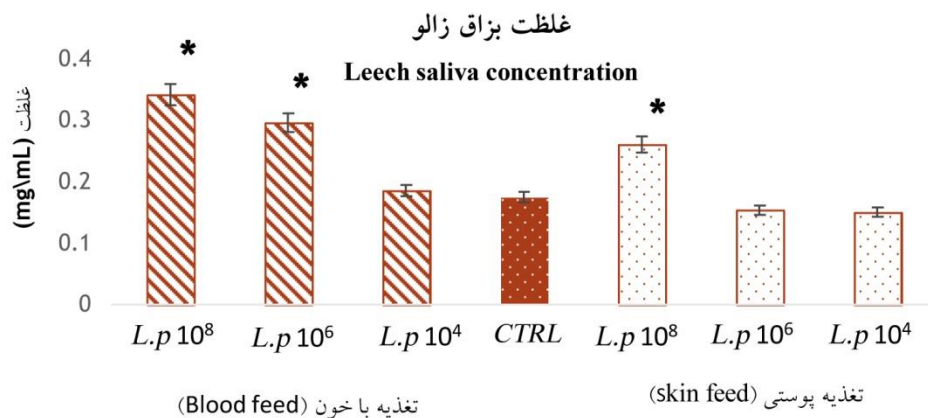
شکل ۱- رسم نمودار استاندارد بردفورد بزاق زالو.

Figure 1. Standard Bradford chart of leech saliva.

در آب و خون، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند. باتوجه به این‌که حداقل میزان بزاق استخراج‌شده از هر زالو: ۲۶ میکروگرم/میکرولتر می‌باشد. در ادامه نتایج نشان داد که استفاده از لاکتوباسیلوس پلاتناروم با غلظت بالا در خون (تیمار 10^8 CFU/mL)، بیش‌ترین اثر را در افزایش تولید بزاق داشت و نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$).

نتایج آزمون بردفورد

غلظت پروتئین بزاق زالو: شکل ۲ نتایج آزمون بردفورد را برای تیمارهای مختلف نشان می‌دهد که میزان غلظت بزاق زالوی طبی تولیدی در تیمارهای 10^8 CFU/mL و 10^6 CFU/mL با مصرف خون و تیمار 10^8 CFU/mL جذب پوستی، تولید بزاق بیش‌تری نسبت به گروه شاهد داشتند ($P < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که تیمارهای 10^4 CFU/mL



شکل ۲- غلظت پروتئین‌های بزاق زالوهای دریافت‌کننده باکتری از طریق خون و پوست با ضریب خطای ($P < 0.05$).

Figure 2. Concentration of salivary proteins of leeches receiving bacteria through blood and skin.

تولیدی در شکل ۳ نشان داد که تیمار 10^8 CFU/mL خون، با بزاق در غلظت ۱ mg/mL حدود ۴۰ درصد مهار سلول‌های سرطانی را نشان داد ($P < 0.05$). همچنین تیمارهای 10^6 CFU/mL خون و 10^4

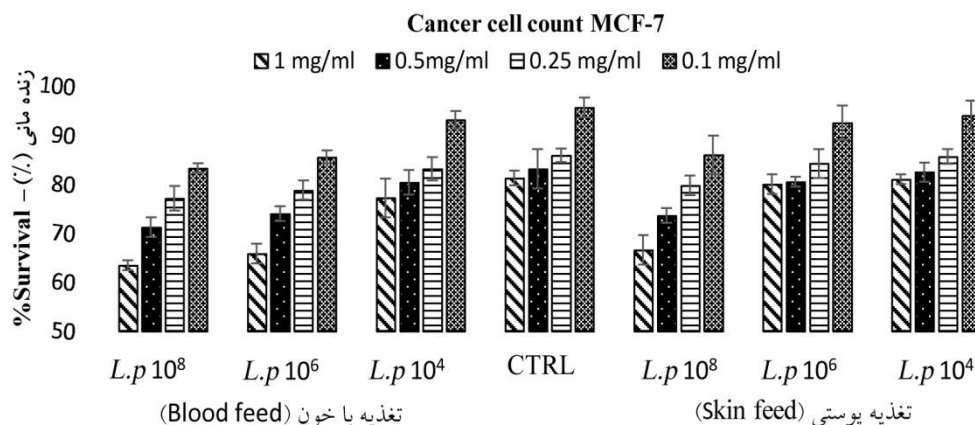
آزمون MTT

بررسی خواص ضدسرطانی بزاق

الف) رده سلولی سرطان پستان انسانی (MCF-7): نتایج بررسی میزان اثر ضد سرطانی بزاق زالوی طبی

نشان می‌دهد که با افزایش غلظت بزاق زالو (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خاصیت کشندگی سلول‌های سرطانی نیز افزایش می‌یابد.

CFU/mL جذب پوستی نیز تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ($P < 0.05$). البته تیمارهای 10^4 CFU/mL (خون و پوست) و 10^6 CFU/mL جذب پوستی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در کل نتایج



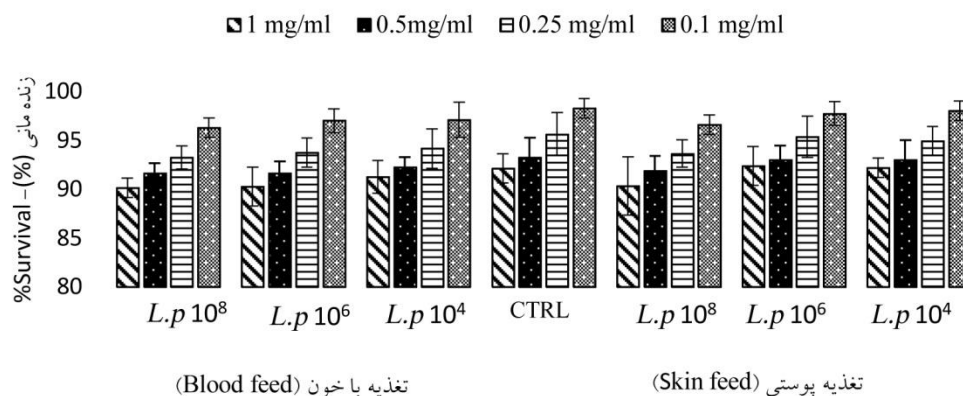
شکل ۳- نمودار میزان اثر بخشی بزاق زالو در غلظت‌های مختلف بر رشد سلول سرطانی MCF-7 با ضریب خطای ($P < 0.05$).

Figure 3. The effectiveness of leech saliva at different concentrations on the growth of MCF-7 cancer cells.

تیمارهای 10^4 و 10^6 CFU/mL خون و 10^8 CFU/mL پوست با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). در کل نتایج تبیین نمود که بزاق زالو با غلظت بالا، بدون آسیب به سلول‌های سالم، اثر درمانی بالاتری بر سلول‌های سرطانی دارد.

ب) رده سلولی فیبروبلاست موش (L929): نتایج بررسی میزان اثر ضدسرطانی بزاق زالوی طبی تولیدی در شکل ۴ نشان داد که میزان کشندگی برای سلول‌های سالم در همه تیمارها کم‌تر از ۱۰ درصد بود، که نشان‌دهنده سازگاری و ایمنی بزاق در شرایط آزمایشگاهی است. هم‌چنین نتایج نشان داد که

سلول‌های فیبروبلاست موش - Mouse fibroblast cells L929



شکل ۴- نمودار میزان اثر بخشی بزاق زالو در غلظت‌های مختلف بر رشد سلول فیبروبلاست L929 با ضریب خطای ($P < 0.05$).

Figure 4. The effectiveness of leech saliva at different concentrations on the growth of L929 fibroblast cells.

بحث

طی یک دهه اخیر، مطالعات بسیاری بر خواص درمانی بزاق زالو، به‌ویژه در مهار سلول‌های سرطانی، قارچ‌ها و باکتری‌ها صورت گرفته است. روش‌های استخراج بزاق نیز متنوع‌تر شده‌اند؛ از جمله روش تحریک روده زالو برای استفراغ و دفع بزاق است (۱۸). در این پژوهش، برای نخستین بار از *Lactobacillus plantarum* به‌عنوان مکمل پروبیوتیکی در دو مسیر تغذیه‌ای (خون و جذب پوستی) استفاده شد تا اثر آن بر غلظت بزاق و خواص ضدسرطانی آن در گونه ایرانی *Hirudo orientalis* بررسی شد و نتایج نشان داد که افزایش غلظت *L. plantarum* با افزایش غلظت پروتئین‌های بزاق رابطه مستقیم دارد. همچنین تیمار با غلظت 10^8 CFU/mL در خون، بالاترین تولید بزاق و اثر ضدسرطانی را داشت و زالوهای تیمار شده با این پروبیوتیک، بزاقی با غلظت بیش از ۳۰۰ µg/mL تولید کردند که بسیار بالاتر از زالوهای روسی با غلظت گزارش شده ۸۰ µg/mL بود (۱۹).

❖ تحلیل احتمالی مکانیسم‌های افزایش بزاق:

۱) تغییر میکروبیوم گوارشی زالو توسط اسیدلاکتیک و سایر متابولیت‌های *L. plantarum* (۲۰).
۲) تحریک مستقیم غدد بزاقی از طریق مولکول‌هایی نظیر پپتیدوگلیکان و اسیدهای آلی (۲۱).
۳) فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی مانند MAPK/ERK یا γ -PPAR که باعث افزایش بیان ژن‌های ترشحی می‌شود (۲۲، ۲۳).

۴) القای تولید پپتیدهای ضد میکروبی مانند هیرودمیسن از طریق سیستم ایمنی زالو (۲۴). با توجه به این مکانیزم‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که اثر مکمل پروبیوتیکی می‌تواند از راه‌های مستقیم و غیرمستقیم، تولید و کیفیت بزاق زالو را بهبود بخشد.

❖ **خواص ضدسرطانی و ضدمتاستاز بزاق:** بزاق زالو حاوی آنزیم‌ها و پروتئین‌هایی با خواص

ضدانعقادی و پروتئازی است که می‌تواند از تشکیل لخته در خون و پخش سلول‌های سرطانی جلوگیری کند (۲۵). این ویژگی‌ها اهمیت زیادی در مهار متاستاز دارند که عامل اصلی بدخیمی و مرگ ناشی از سرطان است (۲۶). مطالعات نشان داده‌اند که بزاق زالو دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی در برابر رادیکال‌های آزاد است که نقش کلیدی در تخریب DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها دارند (۲۷). همچنین خواص ضدسرطانی آن علیه انواع سرطان‌ها مانند سرطان ریه، خون، استخوان و پستان گزارش شده‌اند (۲۸). در این پژوهش، اثر پروبیوتیک در تحریک ترشح بزاقی با خاصیت ضدسرطانی تأیید شد. نمونه‌هایی با بزاق تغلیظ‌شده، زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند؛ درحالی‌که سلول‌های سالم L929 با کم‌تر از ۱۰ درصد مرگ سلولی مواجه شدند، نشانگر خاصیت انتخابی بزاق در برابر سلول‌های سرطانی می‌باشد.

❖ **کاربردهای پرورشی و صنعتی:** نتایج کلی این مطالعه می‌تواند تحول قابل توجهی در صنعت پرورش زالو ایجاد کند. با افزودن پروبیوتیک‌ها به رژیم تغذیه زالوها، می‌توان کیفیت بزاق را ارتقا داد و زالوهایی با اثربخشی درمانی بالا برای مراکز پزشکی تهیه کرد. این امر نه تنها باعث بهبود فرآیند درمان بیماران می‌شود، بلکه می‌تواند بازار فروش و بهره‌وری پرورش‌دهندگان را به‌طور چشم‌گیری افزایش دهد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه مرتبط، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان تشکر ویژه می‌نمایند، همچنین از کارشناسان گروه دانش بنیان صنعت زالوی ایران و شرکت فناوری زیست‌دانه ایرانیان به ویژه مهندس سید محمد توکلی اصفهانی که به‌خاطر فراهم نمودن شرایط انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نماییم.

منابع

1. Khodadoust, K., Khalili, M., Shoja, M., Qabili, K., Prapari, S., & Khodadoust, K. (2014). Leech therapy in traditional Iranian medicine. *Journal of Traditional Medicine of Islam and Iran*, 5, 41-46. [In Persian]
2. Malek, M., & Khodadoust, M. (2015). Iranian medical leech, the wonder of creation over time. *Nasha Alam Journal*, 6, 73-80. [In Persian]
3. Bidmal, H., & Sudagar, M. (2020). The effect of two environments (water-moss and peat moss soil) on the number of cocoons, cocoon weight, and mortality of the oriental leech (*Hirudo orientalis*). *Journal of Plasma and Biomarkers*, 13(4).
4. Firouzbakhsh, S., & Sudagar, M. (2024). A review of the importance of leeches and enzymes derived from their saliva. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*. [In press]
5. Dong, H., Ren, J. X., Wang, J. J., Ding, L. S., Zhao, J. J., Liu, S. Y., & Gao, H. M. (2016). Chinese medicinal leech: Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 7895-7935.
6. Safavipour, S., Modaresi, M., & Emadinia, A. (2017). *Leechology* (2nd ed.). Isfahan Islamic Azad University Publications, pp. 120-125. [In Persian]
7. Kuo, D. H., & Lai, Y. T. (2019). On the origin of leeches by the evolution of development. *Development, Growth & Differentiation*, 61(1), 43-57.
8. Ojo, P. O., Babayi, H., Olayemi, I. K., Peter, O. O., Fadipe, L. A., & Baba, E. (2018). Anti-tubercular activities and molecular characterization of salivary extract of leech against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Tuberculosis Research*, 6(1), 1-9.
9. Mohammad, A. G., & Abdulkader, A. M. (2012). Free radical scavenging activity of the medicinal Malaysian leech saliva extract, *Hirudinaria manillensis*. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 14, 10-14.
10. Mohammad, G. A., Ahmed, M., Abdualrahman, A., & Mohamed, A. (2015). Patent No. 9,149,498, 1-26.
11. Stratton, M. S., Ammar, A., Wang, Y. Z., Hessein, M., Guns, E., Kucuk, O., Merzouk, A., & Kwok, D. (2016). BPS-001, a complex biologic agent extracted from the medicinal leech (*Hirudinaria manillensis*) for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 34-48.
12. Merzouk, A. (2012). Anticancer effects of medical Malaysian leech saliva extract (LSE). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 15, 1-5.
13. Shakouri, A., Adljouy, N., & Abdolalizadeh, J. (2018). Anti-cancer activity of liposomal medical leech saliva extract (LSE). *The 3rd World Congress on Recent Advances in Nanotechnology*, 1-4.
14. Lengauer, T., Rarey, M., & Martínez, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 402-406.
15. Elliott, J. M., Kutschera, U., & Zinenko, O. (2011). Medicinal leeches: Historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Biology*, 4, 21-41.
16. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
17. Wuttke, W. A., Sawyer, R. T., & Berry, M. S. (1989). Extraglandular innervation of the salivary cells of the leech *Haementeria ghilianii*: Neuronal stimulation elicits gland-cell action potentials and secretion. *Journal of Experimental Biology*, 143, 389-410.
18. Alaama, M., AlNajjar, M., Abdulkader, A., Mohammad, A., & Merzouk, A. A. (2011). Isolation and analytical characterization of local Malaysian

- leech saliva. *IIUM Engineering Journal*, 12, 51-59.
19. Karasartova, D., Arslan-Akveran, G., Sensoz, S., Mumcuoglu, K. Y., & Taylan-Ozkan, A. (2025). *Hirudo verbana* microbiota dynamics: A key factor in hirudotherapy-related infections. *Microorganisms*, 13(4), 918.
20. Maltz, M. A., Bomar, L., Lapierre, P., Morrison, H. G., McClure, E. A., Sogin, M. L., & Graf, J. (2014). Metagenomic analysis of the medicinal leech gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 5, 151.
21. Lemke, S., & Vilcinskas, A. (2020). European medicinal leeches—new roles in modern medicine. *Biomedicines*, 8(5).
22. Ceylan, M., Küçükkara, R., Erbatur, İ., Karataş, E., Tunç, M., & Sağlam, N. (2021). Growth, survival and reproduction of the Turkish medicinal leech, *Hirudo sulukii*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 65, 57-68.
23. Vaughan, K. (2009). *Characterization of a hypothetical protein critical for the symbiotic interaction of Aeromonas veronii and Hirudo verbana*. Honors Scholar Theses, 70-120.
24. Worthen, P. L., Gode, C. J., & Graf, J. (2006). Culture-independent characterization of the digestive-tract microbiota of the medicinal leech reveals a tripartite symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4775-4781.
25. Aican, B., İlhan, S., Serap, Y. A., Kenan, K., Seçkin, K., & Merve, K. (2025). Investigating the therapeutic potential of crude leech saliva based on its anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory effects. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(5), 328.
26. Shakouri, A., Parvan, R., Adljouy, N., & Abdolalizadeh, J. (2020). Purification of hyaluronidase as an anticancer agent inhibiting CD44. *Biomedical Chromatography*, 34-48.
27. Ayhan, H., Sevin, S., Karaaslan, S., & Ayaz, F. (2025). Immunomodulatory effects of medicinal leech saliva extract on in vitro activated macrophages. *Immunologic Research*, 73, 1-8.
28. Ammar, A. E., Hassona, M. H., Meckling, G. R., Chan, L. G., Chin, M. Y., & Abdualkader, A. (2015). Assessment of the antitumor activity of leech (*Hirudinaria manillensis*) saliva extract in prostate cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 75(15 Suppl), 5130.