

تاثیر اسانس و انواع عصاره های باریجه (*Ferula gummosa*) بر تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی

مهدی اکبری^۱، دارا دستان^{۲*}، محمد فلاح^۱، محمد متینی^{۱*}

(۱) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
(۲) مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و فرآورده های طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
(۳) گروه فارماکوکینزی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۴

چکیده

مقدمه: عفونت ناشی از تریکوموناس واژینالیس یکی از عفونت های جنسی شایع در جهان بوده که گزارش موارد مقاوم به درمان آن در حال افزایش است. هدف از این تحقیق، مطالعه تاثیر باریجه بر تریکوموناس واژینالیس و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس آن بود.

مواد و روش ها: اسانس و عصاره های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی ریشه باریجه تهیه و آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و درصد مهارکنندگی رشد یا %GI (Growth inhibitory percent) بر روی دو ایزوله تریکوموناس واژینالیس کشت شده در محیط دیاموند در شرایط آزمایشگاهی و در مقایسه با مترونیدازول، انجام گرفت. هم چنین با استفاده از کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف سنج جرمی (GC-MS) ترکیبات اسانس گیاه شناسایی شد.

یافته های پژوهش: بعد از ۲۴ ساعت میزان MIC برای عصاره های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی ۱۲۵ µg/ml و برای اسانس ۵۰۰ µg/ml به دست آمد هم چنین میزان %GI برای انواع عصاره ۵۰ درصد (در غلظت ۶۲/۵ µg/ml) و برای اسانس ۷۰ درصد (در غلظت ۲۵۰ µg/ml) تعیین گردید. میزان MIC مترونیدازول نیز برای یک ایزوله تریکوموناس واژینالیس ۱۲/۵ µg/ml و برای ایزوله دیگر ۶/۲ µg/ml به دست آمد. هم چنین تجزیه اسانس باریجه نشان داد بتا-پینن (۲۸/۷ درصد)، آلفا-پینن (۱۰/۷ درصد) و بتا-ایودسمول (۶/۵ درصد) از ترکیبات اصلی آن هستند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات موجود در اسانس و عصاره های باریجه دارای پتانسیل ضدتریکومونایی قابل توجه ای می باشند. بنا بر این ضروری است با جداسازی این ترکیبات و انجام تحقیقاتی تکمیلی در زمینه تاثیر آن ها بر انگل در شرایط برون تنی و درون تنی اطلاعات جامع تری به دست آید.

واژه های کلیدی: تریکوموناس واژینالیس، باریجه، عصاره، اسانس، کروماتوگرافی گازی

* نویسنده مسئول: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

Email: matini@umsha.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

تریکوموناس واژینالیس تک یاخته ای بی هوازی و تاژک دار از خانواده تریکومونا دیده است که عامل مولد تریکومونیازیس در انسان می باشد. این عفونت از جمله عفونت های جنسی شایع در سراسر جهان بوده به طوری که بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی میزان شیوع سالانه آن با ۲۷۶/۴ میلیون مورد بیش از شیوع گنوره، سیفلیس و عفونت کلامیدیایی است (۱،۲). علائم بالینی تریکومونیازیس در زنان به صورت متنوع از عفونت بدون علامت تا اشکال علامت دار و واژینیت حاد تظاهر می یابد. هم چنین این عفونت می تواند عوارضی مانند تولد زودرس نوزادان، عقیمی و افزایش خطر ابتلا به سرطان دهان رحم را به همراه داشته باشد اما آن چه که اهمیت این عفونت را بیش از گذشته مورد توجه قرار داده است نقش آن در افزایش خطر انتقال ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) می باشد (۳،۱). مترونیدازول از سال ۱۹۶۱ تاکنون، تنها داروی در دسترس برای درمان این عفونت در اغلب کشورها است. استفاده از این دارو در درمان تریکومونیازیس در همان ابتدای کار در سال ۱۹۶۲ با دو چالش شکست درمانی و عوارض جانبی همراه بوده به طوری که مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری ها در آمریکا (CDC) نیز برآورد نموده است ۲ تا ۵ درصد ایزوله های بالینی تریکوموناس واژینالیس به مترونیدازول مقاوم می باشند (۵،۴).

تاکنون محققین مطالعات قابل توجه ای در زمینه بررسی اثرات ضد میکروبی گیاهان مختلف و هم چنین ترکیبات طبیعی حاصل از آن ها انجام داده اند. از جمله این تحقیقات می توان به مطالعات صورت گرفته در رابطه با اثرات گیاهان موسیر ایرانی (Persian shallot)، اکالیپتوس (Eucalyptus)، کامالدولنس (camaldulensis)، ریواس (Rheum ribes L.)، کمای بیابانی (Ferula szowitsiana) و بارهنگ سرنیزهای (Plantago lanceolata L.) بر تریکوموناس واژینالیس اشاره کرد که نتایج مختلفی در بر داشته اند (۱۰-۶). باریجه، با نام علمی (Ferula gummosa) از تیره چتریان، گیاه بومی مناطق شرقی، مرکزی و غرب ایران بوده که دارای ترکیباتی مانند بتا

پینن، آلفا پینن، میرسن، لیمونن، آلفا توچن، پاراسیمن و هم چنین خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد تشنجی است (۱۴-۱۱) در طب سنتی از آن به عنوان یک ضد عفونی کننده، ضد نفخ، ضد تشنج، ضد اسپاسم، تسکین دهنده درد، ضد التهاب و تقویت کننده حافظه استفاده می گردد (۱۵). از فعالیت ضد میکروبی این گیاه می توان به اثر مهارکنندگی اسانس آن بر رشد بر باکتری های گرم مثبت (Staphylococcus aureus, S. epidermis, and Bacillus subtilis) باکتری های گرم منفی (Escherichia coli, Salmonella typhi, and Pseudomonas aeruginosa) و مخمرها (Candida albicans and C. kefyr) اشاره نمود (۱۴،۱۳) هم چنین این مطالعات اثرات ضد میکروبی اسانس باریجه را به وجود ترکیباتی نظیر آلفا و بتاپینن نسبت داده اند.

به دلیل مشکلات بیان شده در زمینه درمان تریکومونیازیس، تحقیق و مطالعه در راستای دست یابی به داروهای جدید با تأثیر درمانی مناسب و عوارض جانبی کمتر برای درمان این عفونت انگلی جزء ضروریات تحقیقات بهداشتی می باشد. با توجه به این که گیاهان دارویی از دیرباز به عنوان منابع اصلی ترکیبات دارویی مطرح بوده و هم چنین به دلیل وجود پتانسیل ضد میکروبی لازم در باریجه و این که تاکنون اثرات ضد تریکومونایی این گیاه مورد ارزیابی قرار نگرفته است، در این تحقیق تأثیر اسانس و انواع عصاره های مختلف آن در شرایط آزمایشگاهی بر تریکوموناس واژینالیس مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت و آماده سازی انگل: این پژوهش قبل از انجام در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی همدان مطرح و با کد IR.UMSHA.REC.1396.885 به تصویب رسید و بعد از آن در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان که در آن از دو ایزوله تریکوموناس واژینالیس کشت داده شده در محیط دیاموند استفاده گردید، انجام شد.

تهیه گیاه، عصاره، اسانس و دارو: ابتدا باریجه از رویشگاه طبیعی خود واقع در استان البرز، شهرستان طالقان جمع آوری شد و پس از شناسایی و مقایسه با نمونه هرباریومی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان با شماره هربارومی ۱۰۶۱ تایید شد. ریشه گیاه پس از جمع آوری در سایه و در دمای محیط خشک گردید. عصاره گیری در آزمایشگاه فارماکونگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی همدان و به روش خیساندن (Maceration) انجام شد. برای استخراج عصاره ها، ریشه گیاه را پودر کرده و سپس به مقدار ۱۰۰ گرم از پودر تهیه شده به ترتیب در حلال های هگزان، اتیل استات، و متانول به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر و در دمای اتاق خیسانده شد. عصاره های به دست آمده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ (انگلیس) عبور داده شدند و سپس جهت تغلیظ در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در دستگاه روتاری (LABoroTA 4000, Heidolph-Germany) قرار گرفتند (۱۶). تهیه اسانس ریشه باریجه نیز با روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر (ایران- فناوری ایرانیان، G-CJ) ظرف ۳ ساعت انجام گردید و از سولفات روی جهت آب گیری و خشک کردن آن استفاده گردید (۱۷). در پایان اسانس و عصاره های حاصل تا زمان آزمایش در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. برای تهیه محلول مترونیدازول نیز ابتدا پودر آن (Sigma Chemical Co. St Louis) با غلظت مشخص در آب مقطر حل و پس از سترون کردن به کمک فیلتر سرنگی با منافذ ۰/۲۲ میکرون، به روش رقیق سازی متوالی دو برابر در محیط کشت انجام گردید تا غلظت های نهایی ۰/۱ تا ۴۰۰ µg/ml در میکروپلیت های آزمایش حاصل گردید.

آزمایش تعیین حساسیت: حداقل غلظت مهارکنندگی یا (Minimum Inhibitory Concentration) MIC عبارت بود از حداقل غلظتی

از اسانس، عصاره و دارو که بعد از انکوباسیون موجب از حرکت افتادن و مرگ تریکوموناس واژینالیس می گردید (۱۸).

تروفوزوئیت های انگل در فاز رشد لگاریتمی و با تعداد مشخص (۲×۱۰^۵ سلول در میلی لیتر) مورد استفاده قرار گرفتند. هم چنین محلول هایی از اسانس، عصاره ها و دارو در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO, D2650 SIGMA, BioReagent) و آب تهیه گردید و غلظت هایی از آن ها در محیط کشت به وسیله روش رقیق سازی متوالی دو برابر در میکروپلیت های سترون آماده شد. سپس به هر چاهک آزمون به میزان برابر (۱۰۰ میکرولیتر) محیط کشت حاوی تروفوزوئیت انگل اضافه گردید تا غلظت های نهایی µg/ml ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲ برای ترکیبات گیاهی حاصل گردید. در انتها میکروپلیت های آزمون در گرمخانه در شرایط هوازی و دمای ۳۵/۵ درجه سانتی گراد گذاشته شدند و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت به وسیله میکروسکوپ معکوس مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایش برای هر ترکیب گیاهی و دارویی و هم چنین برای هر ایزوله انگل، به صورت دوتایی و دو بار تکرار گردید. کلیه مراحل آزمایش در شرایط سترون و در برابر آزمون های شاهد شامل شاهد منفی (عاری از هرگونه ترکیب گیاهی و دارویی)، شاهد مثبت (حاوی مترونیدازول) و شاهد دی متیل سولفوکساید (DMSO) انجام گرفت. در ادامه به منظور تأیید اثر ترکیبات مورد آزمایش بر انگل، پس از انجام آزمون MIC (بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون)، کشت مجدد در محیط تازه انجام گردید.

جهت تعیین درصد مهارکنندگی رشد یا (Growth Inhibitory percent) GI% تعداد انگل های زنده موجود در چاهک مربوط به یک غلظت کمتر از MIC (sub-MIC) در برابر تعداد انگل های زنده موجود در چاهک شاهد (با لام هموسیتومتر)، مطابق فرمول زیر مورد شمارش قرار گرفت و تعیین گردید.

$$GI\% = \frac{\text{میانگین تعداد انگل زنده در چاهک مورد} - \text{میانگین تعداد انگل زنده در چاهک شاهد}}{\text{میانگین تعداد انگل زنده در چاهک شاهد}} \times 100$$

شناسایی کیفی و کمی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس باریجه: شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از روش کوپل شده کروماتوگرافی گازی با طیف سنج جرمی (GC-MS) و دستگاه Thermoquest-Finnigan مدل Trace انجام پذیرفت. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (RI)، مطالعه طیف های جرمی و مقایسه این طیف ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS (Wiley 0/7 و Adams) صورت گرفت (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم افزار SPSS V.16 و آزمون ناپارامتریک فریدمن در سطح معنی داری ۰/۰۵ جهت تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین های MIC ترکیبات مورد آزمایش، استفاده گردید.

یافته های پژوهش

به منظور ارزیابی میزان تأثیر اسانس و عصاره های هگزانی، اتیل استاتی، متانولی باریجه بر روی دو ایزوله تریکوموناس واژینالیس و هم چنین مقایسه تأثیر آن با مترونیدازول، غلظت های متوالی (۴۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲) از این

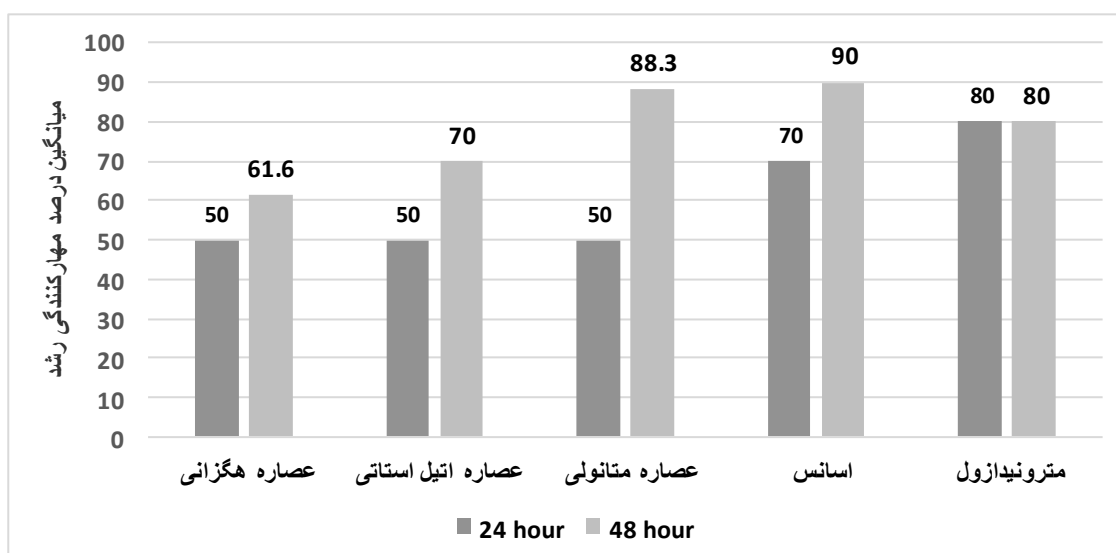
ترکیبات تهیه و در مجموع برای هر ترکیب گیاهی ۸ سری آزمایش انجام گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش ها نشان داد که اسانس و انواع عصاره های باریجه دارای خاصیت ضدتریکومونایی بوده و بر رشد و حیات انگل تأثیر می گذارند. همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می گردد عصاره های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی باریجه تأثیر یکسانی بر تریکوموناس واژینالیس داشته و در مقایسه با اسانس باریجه دارای فعالیت ضدتریکومونایی بیشتری هستند. هم چنین نتایج نشان دهنده تأثیر یکسان ترکیبات گیاهی بر هر دو ایزوله تریکوموناس واژینالیس است. کشت مجدد تروفوزوئیت های در معرض مواد گیاهی قرار گرفته در محیط تازه و فاقد هر گونه ترکیب ضدتریکومونایی و عدم مشاهده رشد و تکثیر تروفوزوئیت ها طی ۱۰ روز بررسی محیط های کشت، نشان دهنده تأثیر کشندگی مواد مورد آزمایش بر همه تروفوزوئیت های انگل در MIC مربوط به هر ترکیب دارد. نتایج تست حساسیت دارویی نیز نشان داد که هر دو ایزوله انگل نسبت به مترونیدازول حساس بوده و میانگین MIC مترونیدازول آن ها (۴/۶ μg/ml) تعیین گردید.

جدول شماره ۱. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مترونیدازول، اسانس و انواع عصاره های باریجه بر روی تریکوموناس واژینالیس

P	میانگین MIC (μg/ml)	ایزوله Tv2 MIC (μg/ml)	ایزوله Tv1 MIC (μg/ml)	ترکیبات ضدتریکومونایی	زمان انکوباسیون
۰/۰۰۴	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عصاره هگزانی	۲۴ ساعت
	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عصاره اتیل استاتی	
	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عصاره متانولی	
	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	اسانس	
	۹/۳	۱۲/۵	۶/۲	مترونیدازول	
۰/۰۰۴	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عصاره هگزانی	۴۸ ساعت
	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عصاره اتیل استاتی	
	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عصاره متانولی	
	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	اسانس	
	۴/۶	۶/۲	۳/۱	مترونیدازول	

اسانس باریجه نشان داد که ترکیبات اصلی موجود در آن بتا-پینن (۲۸/۷ درصد)، آلفا-پینن (۱۰/۷ درصد) و بتا-ایودسمول (۶/۵ درصد) بودند. دسته ترکیب مونوترپن ها (۶۳/۳ درصد) بیشترین میزان ترکیبات اسانس را شامل می شد و در ادامه سسکویی ترپن ها با ۳۴/۴ درصد بیشترین ترکیبات اسانس را تشکیل می داد (جدول شماره ۲).

در این مطالعه درصد مهارکنندگی رشد (GI%) اسانس و عصاره ها در یک غلظت کمتر از (sub-MIC) نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد همه ترکیبات مورد آزمایش در غلظت sub-MIC دارای درصدی از مهارکنندگی رشد بودند (نمودار شماره ۱) که با افزایش زمان تماس ترکیبات گیاهی با انگل، میزان GI% نیز افزایش می یافت. هم چنین تجزیه



نمودار شماره ۱. میانگین درصد مهارکنندگی رشد (GI%) مترونیازول، اسانس و انواع عصاره های باریجه در غلظت sub-MIC بر روی تریکوموناس واژینالیس

جدول شماره ۲. ترکیبات شیمیایی اسانس ریشه باریجه

ردیف	ترکیبات	درصد	شاخص بازاری a
۱	α -Thujene	۱/۵	۹۲۶
۲	α -Pinene	۱۰/۷	۹۳۲
۳	Camphene	۱/۷	۹۵۳
۴	Sabinene	۰/۲	۹۶۹
۵	β -Pinene	۲۸/۷	۹۷۴
۶	3-Carene	۰/۱	۱۰۱۱
۷	α -Terpinene	۰/۲	۱۰۱۸
۸	p-Cymene	۰/۶	۱۰۲۶
۹	Limonene	۲/۸	۱۰۳۱
۱۰	β -E-Ocimene	۰/۵	۱۰۵۰
۱۱	γ -Terpinene	۰/۳	۱۰۶۲
۱۲	α -Terpinolene	۲/۱	۱۰۸۸
۱۳	Linalool	۰/۸	۱۰۹۵
۱۴	α -Campholenal	۱/۳	۱۱۲۵
۱۵	Borneol	۱/۲	۱۱۶۵
۱۶	p-Mentha-1,5 dien-8-ol	۱	۱۱۷۲
۱۷	Terpinen-4-ol	۲/۱	۱۱۷۴
۱۸	α -Terpineol	۳/۱	۱۱۸۹
۱۹	Myrtenal	۱/۱	۱۱۹۳
۲۰	Myrtenol	۱/۲	۱۱۹۴
۲۱	Verbenone	۰/۶	۱۲۰۴
۲۲	Bornyl acetate	۱/۵	۱۲۸۵
۲۳	δ -Elemene	۳	۱۳۳۵
۲۴	α -Cubebene	۰/۱	۱۳۵۱
۲۵	α -Copaene	۱/۴	۱۳۷۶
۲۶	Germacrene D	۰/۱ $\geq$	۱۳۹۹
۲۷	trans-Caryophyllene	۱/۹	۱۴۱۸
۲۸	β -Gurjunene	۰/۱	۱۴۳۲
۲۹	α -Humulene	۰/۵	۱۴۵۲
۳۰	γ -Muurolene	۰/۱	۱۴۷۷
۳۱	Germacrene D	۳/۱	۱۴۸۴

۱۴۹۴	۱/۹	Bicyclogermacrene	۳۲
۱۵۰۲	۰/۱	Cuparene	۳۳
۱۵۱۳	۲/۳	γ -Cadinene	۳۴
۱۵۲۴	۰/۹	δ -Cadinene	۳۵
۱۵۳۸	۰/۱	α -Cadinene	۳۶
۱۵۴۴	۰/۳	α -Calacorene	۳۷
۱۵۴۸	۰/۱	Elemol	۳۸
۱۵۴۶	۱/۲	E-Nerolidol	۳۹
۱۵۷۶	۱/۳	Spathulenol	۴۰
۱۵۵۹	۱/۴	Germacrene B	۴۱
۱۶۰۶	۰/۱	Humulene epoxide	۴۲
۱۶۳۰	۱/۱	γ -Eudesmol	۴۳
۱۶۴۹	۶/۵	β -Eudesmol	۴۴
۱۶۵۳	۲/۵	α -Cadinol	۴۵
۱۶۸۵	۱/۲	α -Bisabolol	۴۶
۱۷۶۲	۳/۲	Caryophyllenol	۴۷
	۶۳/۳	Monoterpene	۴۸
	۳۴/۴	Sesquiterpene	۴۹
	۹۷/۷	مجموع	

a شاخص بازداری (Retention Index) نسبت به نرمال آلکان های C7-C24 در ستون DB-5.

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد باریجه از خاصیت ضدتریکومونایی قابل توجهی برخوردار بوده به طوری که عصاره های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی آن در غلظت $125 \mu\text{g/ml}$ بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون نه تنها قادر بود مانع رشد و تکثیر تریکوموناس واژینالیس گردد بلکه باعث مرگ همه تروفوزوئیت ها نیز گردیده بود. اسانس باریجه نیز بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در غلظت $500 \mu\text{g/ml}$ باعث مرگ انگل ها در محیط آزمایش شده بود. هم چنین نتایج نشان داد که ترکیبات باریجه در یک غلظت کمتر از MIC (برای انواع عصاره های باریجه در غلظت $62/5 \mu\text{g/ml}$ و برای اسانس باریجه در غلظت $250 \mu\text{g/ml}$) نیز دارای درصدی اثر مهارکنندگی از رشد انگل می باشد که میزان GI% آن ها با افزایش زمان تماس از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت افزایش می یافت. فعالیت ضد میکروبی این گیاه را می توان ناشی از اثرات ترکیبات زیست فعالی مانند ترکیبات فنلی، کارواکرول، تیمول، بتا پینن، میرسن، لیمونن، پاراسیمین دانست (۱۴). نتایج تست حساسیت دارویی ایزوله ها هم نشان داد ایزوله های مورد استفاده در این تحقیق به مترونیدازول حساس بودند.

تاکنون محققین تأثیر تعدادی از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی مناطق مختلف دنیا را بر تریکوموناس واژینالیس مورد مطالعه قرار داده اند که نتایج مختلفی را در بر داشته است. یکی از این گیاهان مورد مطالعه اسطوخودوس است که بومی مناطق خشک و نیمه خشک جنوب اروپا می باشد. Moon و همکاران تأثیر اسانس دو گونه از گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*, L. $\times$ *intermedia*) را بر تریکوموناس واژینالیس، ژیا ردیا لامبلیا و هگزامیتا اینفلاتا مورد آزمایش قرار دادند. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت ۱ درصد اسانس این گیاهان می توانند باعث مرگ همه انگل های مذکور و از جمله تریکوموناس واژینالیس گردند (۲۰). در مطالعه ای دیگر در مکزیک که توسط Calzada و همکاران انجام شد تأثیر عصاره متانولی ۲۲ گونه از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی را بر تریکوموناس واژینالیس مورد بررسی قرار دادند. از این تعداد گیاه دو گونه بیشترین تأثیر را بر این انگل داشتند. یکی از این گیاهان دانه خربزه درختی (*Carica papaya*) و دیگری فیبر پوسته نارگیل (*Cocos nucifera*) بود که عصاره متانولی آن ها به ترتیب دارای اثر مهارکنندگی برابر با $IC_{50}=5/6 \mu\text{g/ml}$ و

بود که در مقایسه با عصاره متانولی باریجه $IC_{50}=5/8$ که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت از تاثیر بیشتری بر تریکوموناس واژینالیس برخوردار می باشد (۲۱). از مطالعات دیگر می توان به تحقیق صورت گرفته با استفاده از عصاره اتیل استاتی برگ گونه درخت توت فرنگی (*Arbutus unedo*) اشاره نمود. در این مطالعه غلظت $500 \mu g/ml$ عصاره مذکور باعث مرگ انگل در محیط آزمایشگاهی گردید. این میزان تاثیر عصاره اتیل استاتی برگ درخت توت فرنگی کمتر از تاثیر عصاره اتیل استاتی باریجه و برابر تاثیر اسانس باریجه در مطالعه حاضر می باشد (۲۲). از تحقیقات صورت گرفته در ایران، می توان به مطالعه تاران و همکاران در رابطه با بررسی تاثیر موسیر ایرانی (*Persian shallot*) بر تریکوموناس واژینالیس اشاره نمود. این تحقیق نشان داد عصاره هیدروالکلی و دی کلرومتانی موسیر (*Allium hirtifolium*) به ترتیب در غلظت های $10 \mu g/ml$ و $5 \mu g/ml$ بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون باعث مهار رشد و مرگ این انگل می گردد و این در حالی بود که در مقابل MIC مترونیدازول در این مطالعه $2 \mu g/ml$ تعیین گردید (۶). این تاثیر قابل توجه ترکیبات موسیر بر انگل می تواند ناشی از حضور ترکیبات ارگانوسولفور از قبیل آلیسین (*allicin*) و آجوئن (*ajoene*) در گیاهان جنس *Allium* باشد که توان ضد میکروبی قوی به این گونه از گیاهان بخشیده است. گیاه ریواس هم از جمله گیاهانی است که تاثیر آن بر تریکوموناس واژینالیس مورد بررسی قرار گرفته است. نائمی و همکاران نشان داده اند که انواع عصاره های اندام هوایی ریواس (*Rheum ribes L.*) در غلظت های $0/5$ و $1 mg/ml$ قادر به کشتن و از بین بردن انگل در محیط آزمایش هستند (۸). این میزان اثربخشی ریواس از تاثیر عصاره های باریجه بر انگل که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت، کمتر می باشد. کمای بیابانی (*Ferula szowitsiana*) از خانواده چتریان، دیگر گیاهی است که تاثیر آن مورد مطالعه قرار گرفته است. عصاره متانولی کمای بیابانی در غلظت $2 mg/ml$ بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون مانع رشد انگل

گردید و هم چنین غلظت $0/36 mg/ml$ آن قادر به از بین بردن ۵۰ درصد از انگل ها در محیط کشت بود (۹). نتیجه این مطالعه هم حاکی از توان ضد تریکومونایی بیشتر باریجه نسبت به کمای بیابانی دارد. تاثیر اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) بر انگل هم توسط حسنی و همکاران مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج این مطالعه هم نشان داد عصاره اتیل استاتی موثرترین عصاره اکالیپتوس بر تریکوموناس واژینالیس است که در غلظت $12/5 mg/ml$ بعد از ۲۴ ساعت ۱۰۰ درصد مانع رشد و تکثیر انگل می گردد (۷) که این میزان تاثیر به مراتب کمتر از تاثیر عصاره اتیل استاتی باریجه ($125 \mu g/ml$) بر تریکوموناس واژینالیس می باشد. در مطالعه حاضر سعی شد از روش استاندارد و پیشنهادی CDC برای انجام تست حساسیت دارویی استفاده گردد تا نتایج تاثیر ترکیبات گیاهی با مترونیدازول بیشتر قابل قیاس باشد. اما از نقاط ضعف این مطالعه عدم دسترسی به ایزوله های مقاوم به مترونیدازول و ارزیابی تاثیر اسانس و عصاره های مورد آزمایش بر گونه های مقاوم بود.

نتایج مطالعه حاضر آشکار ساخت که ترکیبات و عناصر موجود در اسانس و عصاره های باریجه پتانسیل لازم برای ممانعت از رشد و هم چنین کشتن تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس در محیط آزمایشگاهی را دارا هستند بنا بر این تحقیقات و مطالعات کامل تری در رابطه با استخراج و خالص سازی جزء یا اجزاء موثر در این ترکیبات و هم چنین بررسی تاثیرات آن ها بر انگل در شرایط برون تنی و مدل حیوانی، لازم می باشد تا قضاوت صحیح تری از فعالیت ضد تریکومونایی این گیاه صورت گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله استخراج شده از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی بوده که بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به دلیل حمایت مالی (شماره طرح ۹۶۱۲۱۵۸۱۹۶) و معنوی از این طرح تحقیقاتی، اعلام می دارند.

References

- Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. Clin Microbiol Rev 2004;17: 794-803. doi: 10.1128/CMR.17.4.794-803.2004.
- World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections 2008. Geneva 2012; 2:23-8.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. Clin Microbiol Rev 1998;11:300-17.
- Schmid G, Narcisi E, Mosure D, Secor WE, Higgins J, Moreno H. Prevalence of metronidazole resistant Trichomonas vaginalis in a gynecology clinic. J Reprod Med 2001;46:545-9.
- Workowski KA, Berman SM. Centers for disease control and prevention sexually transmitted disease treatment guidelines. Clin Infect Dis 2011;53:S59-S63. doi: 10.1093/cid/civ771.
- Taran M, Rezaeian M, Izaddoost M. Invitro antitrichomonas activity of Allium hirtifolium persian shallot in comparison with Metronidazole. Iranian J Publ Health 2006;35:92-94.
- Hassani S, Asghari G, Yousefi H, Kazemian A, Rafieiean M, Yousofidarani H. Effects of different extracts of Eucalyptus camaldulensis on Trichomonas vaginalis parasite in culture medium. Adv Biomed Res 2013;2:47. doi: 10.4103/2277-9175.114187.
- Naemi F, Asghari G, Yousofi H, Yousefi HA. Chemical composition of essential oil and anti trichomonas activity of leaf stem and flower of Rheum ribes L. extracts. Avic J Phytomed 2014;4:191-199.
- Khanmohammadi M, Ganji S, Reyhanirad S. Anti-protozoan effects of methanol extracts of the Ferula szowitsiana on the Trichomonas vaginalis trophozoites in vitro. IJWHRS 2014;2:301-6.
- Matini M, Bakhtiarnejad S, Dastan D, Maghsood AH, FallahM. [In vitro efficacy of Plantago lanceolata L. extracts on Trichomonas vaginalis]. AMUJ 2017;20:74-82. (Persian)
- Keramati K, Asghari Baghkheirati A. [The effect of hydroalcoholic extract of Ferula gummosa on visceral pain in mice experimental study]. Anesthesiol Pain 2016;7:30-7. (Persian)
- Eftekhari F, Yousefzadi M, Borhani K. Antibacterial activity of the essential oil from Ferula gummosa seed. Fitoterapia 2004;75:758-9. doi: 10.1016/j.fitote.2004.09.004.
- Abbaszadegan A, Gholami A, Mirhadi H, Saliminasab M, Kazemi A, Moein MR. antimicrobial and cytotoxic activity of Ferula gummosa plant essential oil compared to NaOCl and CHX a preliminary in vitro study. Res Dent Endod 2015;40:50-7. doi: 10.5395/rde.2015.40.1.50.
- Ghasemi Y, Faridi P, Mehregan I, Mohagheghzadeh A. Ferula gummosa fruits an aromatic antimicrobial agent. Chem Nat Comp 2005;41:311-4.
- Mahboubi M. Ferula gummosa a traditional medicine with novel applications. J Diet Suppl 2016;13:700-18. doi: 10.3109/19390211.2016.1157715.
- Ghahremanimajd H, Dashti F, Dastan D, Mumivand H, Hadian J, Esnaashari M. antioxidant and antimicrobial activities of Iranian mooseer Allium hirtifolium boiss populations. Hort Environ Biotechnol 2012;53:116-22. doi: 10.1007/s13580-012-0131-2.
- Dastan D, Salehi P, Maroofi H. Chemical composition antioxidant, and antimicrobial activities on Laserpitium carduchorum hedge and Lamond essential oil and extracts during various growing stages. Chem Biodive 2016;13:1397-403. doi: 10.1002/cbdv.201600087.
- Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, Odonoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan Trichomonas vaginalis. Cell Res 2003;13:239-249. doi: 10.1038/sj.cr.7290169.
- Pezhmanmehr M, Dastan D, Ebrahimi SN, Hadian J. Essential oil constituents of leaves and fruits of Myrtus communis L. from Iran. J Essent Oil Bear Pl 2010;13:123-9. doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643800.

20. Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against Giardia duodenalis Trichomonas vaginalis and Hexamita inflata. Parasitol Res 2006;99:722-8. doi: 10.1007/s00436-006-0234-8.
21. Calzada F, Yepezmulia L, Tapiacntreras A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on Trichomonas vaginalis trophozoites. J Ethnopharmacol 2007; 113: 248-51. doi: 10.1016/j.jep.2007.06.001.
22. Ertabaklar H, Kivcak B, Mert T, Ozensoy S. In vitro Activity of Arbutus unedo Leaf extracts against Trichomonas vaginalis trophozoites. Turkiye Parazit Derg 2009; 33: 263 -5.

In-vitro Activity of Ferula gummosa Essential Oil and Its Different Extracts on Trichomonas vaginalis

Akbari M¹, Dastan D^{2,3}, Fallah M¹, Matini M^{1*}

(Received: August 26, 2018

Accepted: November 21, 2018)

Abstract

Introduction: *Trichomonas vaginalis* infection is one of the most common sexually transmitted diseases worldwide. Moreover, there are reports indicating the increasing rate of refractory trichomoniasis. The aim of this study was to evaluate the efficacy of *Ferula gummosa* on *T. vaginalis*. To this end, the chemical compositions of *Ferula gummosa* essential oil were identified in this study.

Materials & Methods: The essential oil, n-hexane, ethyl acetate, and methanol extract of *F. gummosa* were prepared and subjected to minimum inhibitory concentration (MIC) and growth inhibitory percent (GI%) determination against two in vitro axenic cultured *T. vaginalis* isolates in comparison to metronidazole. Moreover, the chemical compositions of *F. gummosa* essential oil were identified using gas chromatography coupled to a mass spectrometer. **Ethics code:** IR.UMSHA.REC.1396.885

Findings: After 24 h incubation, the MIC of n-hexane, ethyl acetate, and methanol

extract was 125 µg/ml and for that of essential oil was 500 µg/ml. The GI% values were 50% and 70% for the extracts at a concentration of 62.5 µg/ml and the essential oil at a concentration of 250 µg/ml, respectively. In addition, the metronidazole MIC values were 12.5 and 6.2 µg/ml for *T. vaginalis* isolates. According to the results obtained from the chemical identification of *F. gummosa* essential oil composition, three main compounds of its essential oil include β-Pinene (28.7%), α-Pinene (10.7%), and β-Eudesmol (6.5%).

Discussion & Conclusions: The results showed that the compounds in the essential oil and extracts of *F. gummosa* had a significant antitrichomonal activity. Therefore, it is necessary to isolate these compounds and conduct further research on their effects on *T. vaginalis* parasites.

Keywords: Extract, Essential oil, *Ferula gummosa*, Gas Chromatography, *Trichomonas vaginalis*

1. Dept of Medical Parasitology and Mycology Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

2. Medicinal Plants and Natural Products Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

3. Dept of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

*Corresponding author Email: matini@umsha.ac.ir