

بررسی اثر ضد تریکومونایی عصاره‌های گیاهان ریواس و رازیانه بر روی تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی

مریم نیتی^{الف*}، زینب جنیدی^ب، محمد کمالی نژاد^ج، علی حقیقی^د، ناصر ولایی^ه، علیرضا ابدی^و، سودابه حیدری^ز

الف دانشیار و عضو هیئت علمی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرم‌سیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

ب دانشجوی دکتری پزشکی ملکولی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
ج پژوهشگر و محقق دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

د استاد و عضو هیئت علمی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
ه پژوهشگر و محقق دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

ه دانشیار و عضو هیئت علمی، گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

ز دانشجوی دکتری انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: تریکومونایزیس یکی از بیماری‌های شایع غیر ویروسی دستگاه ادراری - تناسلی است که توسط تاژکدار تریکوموناس واژینالیس ایجاد می‌شود. مترونیدازول و تینیدازول دو داروی انتخابی در درمان تریکومونایزیس هستند، اما سلطان‌زایی بالقوه، اثرات تراویژنیک بر جنین و مقاومت این ارگانیسم به مترونیدازول گزارش شده است. با توجه به اثرات سایتو توکسیک گیاهان دارویی از جمله ریواس و رازیانه بر ارگانیسم‌های میکروبی و به منظور تعیین تأثیر دو گیاه مذکور بر روی تریکوموناس واژینالیس، در این مطالعه امید است با استفاده از گیاهان فوق بتوان ترکیب دارویی گیاهی مؤثری معرفی شود.

مواد و روش‌ها: تحقیق به طریق تجربی انجام گرفت. از عصاره آبی الکلی گل ریواس غلظت‌های ۱۰۰-۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و از عصاره آبی دانه رازیانه غلظت‌های ۷۵-۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. جهت کشت انگل تریکوموناس واژینالیس محیط TYI-S-33 ساخته شد. پس از رسیدن به میزان مورد نظر ۱۰^۶ در میلی لیتر، انگل با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها مجاور شد. سپس اثرات بازدارندگی عصاره‌ها در کار گروه‌های کترول مثبت مترونیدازول و کترول منفی بررسی شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل اندازه‌های تکراری (Repeated measures) با کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها: اثر بازدارندگی تأثیر عصاره آبی الکلی گیاه ریواس ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مجاورت با تکیاخته تریکوموناس واژینالیس در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب، ۹۷/۸ درصد و ۱۰۰ درصد بود. درصد ممانعت از رشد انگل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دانه گیاه رازیانه نیز بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ۷۶ درصد اثر بازدارندگی از رشد انگل در زمان ۲۴ ساعت ردیابی شد و در زمان ۴۸ ساعت، ۷۹/۴ درصد قدرت بازدارندگی مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که اثر ضد تریکومونایی گیاه عصاره آبی الکلی گل ریواس، بیش از عصاره آبی گیاه رازیانه است. مطالعات بعدی در خصوص جداسازی مواد مؤثره ریواس بر انگل مذکور و تحقیقات *in vivo* در انسان جهت استفاده آنها ضروری است..

کلید واژه‌ها: تریکوموناس واژینالیس، ریواس (*Rheum ribes*), رازیانه (*Foeniculum vulgare*), شرایط آزمایشگاهی.
تاریخ دریافت: خرداد ۹۴
تاریخ پذیرش: مهر ۹۴

مقدمه:

تریکومونایزیس شایع ترین بیماری غیر ویروسی قابل انتقال از راه تماس جنسی است. این بیماری توسط تکیاخته بالینی تریکومونایزیس در زنان شامل طیف گسترده‌ای از علائم شامل التهابات شدید، خارش، ترشحات فراوان کف‌آلود،

گیاهی نزد مردم دارای مقبولیت بیشتری در هنگام مصرف است. (۹) این دلایل علت افزایش موج جدید مطالعات گسترده و معرفی اثرات ضد میکروبی گیاهان مختلف در سالهای اخیر بوده است. در این میان گیاهان دارویی به خصوص مواردی که خاصیت ضد میکروبی آنها در مطالعات دیگر مشخص شده، توجه محققان را به خود جلب کرده است. تاکنون اثرات ضد تریکومونیازیس چند گونه گیاهی از جمله موسیر، بومادران، برگ گردو، افسنتین در سالهای اخیر گزارش شده است (۱۰-۱۲). رازیانه با نام علمی *Rheum Foeniculum vulgare* و ریواس با نام علمی *Ribes* گیاهانی هستند که در طب سنتی به عنوان داروی گیاهی ضد میکروب از آنها نام برده می‌شود. عصاره تهیه شده از این دو گیاه و یا گیاهان هم خانواده این چهار گونه مانند زنیان و زیره در محیط آزمایشگاهی مانع رشد و یا باعث از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها شده است. به عنوان مثال بررسی اثر ضد میکروبی رازیانه بر روی اشرشیا کولای، باسیلوس سوتیلیس (*Bacillus subtilis*)، استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سرثوس (۱۳، ۱۴، ۱۵) بیانگر مؤثر بودن احتمالی این گیاهان بر روی میکروارگانیسم‌های دیگر از جمله تریکوموناس واژینالیس است.

هدف این تحقیق با توجه به عوارض جانبی مترونیدازول و مقاومت‌های گزارش شده انگل تریکوموناس واژینالیس نسبت به این دارو این است که با بهره‌گیری از گیاهان ذکر شده بتواند ترکیب مؤثر ضد تریکومونیازیس معرفی کند.

مواد و روش‌ها:

۱- تهیه گیاهان

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. در این بررسی گیاهان رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* و گل ریواس با نام علمی *Rheum ribes* زیر نظر مهندس محمد کمالی نژاد، پژوهشگر دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، از مرکز معتبر فروش گیاهان دارویی خریداری شد. شناسایی و تأیید گیاهان توسط خود ایشان صورت گرفت.

ترشحات موکوسی بد بو و سوزش ادرار است. تظاهرات بالینی در مردان شامل سوزش هنگام دفع ادرار، داشتن ترشحات شفاف یا موکوسی، سوزش و خارش شدید بعد از خروج ادرار است. البته اغلب در هر دو جنس (خصوصاً در مردان) حتی در آلدگی‌های زیاد هم علامتی دیده نمی‌شود. (۱) عوارض مرتبط با تریکومونیازیس در زنان شامل زایمان زودرس، تولد نوزادان کم وزن، سقط جنین، پارگی زودرس کیسه آب، حاملگی خارج رحم، اندومتریت پس از زایمان، سالپیتیت، سرویسیت مزمن، سرطان سرویسک و نازابی برگشت‌پذیر است و در مردان شامل پروستاتیت، التهاب اپیدیدیم، اورتریت، بیماری‌های اوترال و حتی ناباروری است. (۲ و ۳) این تاثکدار نقش بالقوه‌ای در ابتلاء به عفونت‌های ثانویه مانند ویروس پاپیلومای انسانی دارد و بروز سلطان گردن رحم و بیماری التهاب لگن نیز در اثر تریکوموناس واژینالیس ممکن است. (۴) میزان شیوع در زنان در بین جمعیت‌های مختلف بین ۵ تا ۷۴ درصد گزارش شده است. (۵) شیوع این انگل در کشور ایران بین ۱۵/۷ - ۲/۱ درصد برآورد شده است. (۶) داروی انتخابی برای درمان بیماری تریکومونیازیس مترونیدازول و تینیدازول است، اما در سالهای اخیر گزارش‌هایی مبنی بر کارسینوژن بودن این داروها و همچنین موارد مقاومت دارویی نسبت به مترونیدازول گزارش شده است. (۷) اینگونه موارد ضرورت یافتن داروی جایگزین را برای درمان تریکومونیازیس مشخص می‌کند. شواهد به جای مانده از دوران قدیم نشان می‌دهد که گذشتگان از گیاهان به عنوان دارو در درمان بیماری‌ها استفاده می‌کردند. با گسترش شاخه‌های مختلف علوم، استفاده از مواد شیمیایی در تولید داروها، توجه محققان را به خود معطوف کرد، اما طی مدت زمان کوتاهی عوارض آنها شناخته شد، لذا پژوهشگران مجدداً مجبور به استفاده از ترکیبات گیاهی در درمان بیماری‌ها شدند. (۸) از طرفی استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی علیه این داروها شده است. همین موضوع یکی از دلایل استفاده رو به رشد از گیاهان به عنوان مواد طبیعی کم خطر، در دسترس و ارزان قیمت، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتیک، در درمان عفونت‌های میکروبی بوده است. همچنین داروهای

(۱۷) در همین راستا، لوله‌های حاوی محیط کشت تازه را از یخچال خارج شد تا دمای آن به دمای اتاق برسد، سپس مشخصات نمونه روی لوله‌ها ثبت شد. در مرحله بعد، لوله‌های حاوی انگل را در انکوباتور 37°C قرار داده شدند و هر روز توسط میکروسکوپ معکوس از نظر رشد انگل بررسی شدند، برای بررسی دقیق رشد انگل، در شرایط کاملاً استریل در کنار شعله از محیط کشت به وسیله سمپلر حاوی نوک سمپلر استریل، ۵۰ میکرولیتر از لوله حاوی انگل روی لام قرار داده شد و زیر میکروسکوپ با عدسی $\times 40$ بررسی شد. به منظور شمارش انگل، لوله محیط کشت TYI-S-33 حاوی انگل بعد از فاز لوگاریتمی (۴۸-۷۲ ساعت بعد از پاساژ) انتخاب و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در شرایط استریل محلول رویی با استفاده از پیپت پاستور استریل دور ریخته شد و سلول‌های رسوبی با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. در این تحقیق نیاز به ۱۰۶ انگل در هر میلی لیتر محیط کشت بود. به منظور محاسبه تعداد انگل در هر میلی لیتر از محیط کشت از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{ml} = X \cdot Y \cdot 104 / \text{تعداد تروفوزوئیت زنده}$$

X: میانگین تعداد انگل در مربع‌های ۱۶ خانه‌ای

Y: عکس فاکتور رقت

۱۰۴: تبدیل حجم cm^3 به mm^3 ، به $1/10$ مربوط به هر مربع ۱۶ خانه‌ای

۵- بررسی تأثیر عصاره‌ها بر روی تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس

بررسی تأثیر عصاره‌ها بر روی تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس بر اساس حداقل غلظت بازدارندگی MIC (Minimum Inhibitory Concentration) صورت می‌گیرد. زمانی که تعداد 10^6 تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس در هر میلی لیتر از محیط کشت TYI-S-33 شمارش شد، در کنار شعله به مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط به لوله بروسیلیکات استریل اضافه شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های عصاره مورد مطالعه به همان لوله بروسیلیکات استریل اضافه شد، سپس از لوله فوق ۱۰۰۰

-۲- تهیه عصاره هیدروالکلی از گل گیاه ریواس (Foeniculum vulgare) و آبی رازیانه (Rheum ribes) عصاره‌گیری به روش ماسراسیون طبق تحقیقات گذشته انجام شد. (۱۶) به این منظور ۱۰۰ گرم از گل گیاه ریواس خشک شده را پس از آسیاب کردن، در یک ظرف ریخته و مقدار ۱۰۰۰ میلی لیتر الكل اتیلیک و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب به آن اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت محتويات ظرف را به کمک کاغذ صافی در محیط آزمایشگاه صاف و سپس ظرف حاصل روی بن ماری قرار داده شد. پس از تبخیر حلال، عصاره خشک حاصل شد، که به ازای هر ۱۰۰ گرم ریواس ۸ گرم عصاره به دست آمد. در خصوص گیاه رازیانه ۱۰۰ گرم از پودر دانه گیاهان رازیانه را پس از آسیاب کردن، به یک لیتر آب مقطری که جوش آمده اضافه شد، و سریع ظرف از روی حرارت برداشته شد، پس از گذشت ۴ ساعت محتويات ظرف، به کمک کاغذ صافی در محیط آزمایشگاه صاف شد، سپس ظرف حاصل روی بن ماری قرار داده شد، پس از تبخیر حلال، عصاره خشک حاصل شد، که به ازای هر ۱۰۰ گرم رازیانه، ۱۴ گرم عصاره به دست آمد. مقادیر مورد نیاز از عصاره، به کمک ترازوی حساس 0.001 میلی گرمی توزین و در مقدار معینی از محیط کشت حل شد تا عصاره با غلظت مورد نیاز به دست آید.

۳- تهیه غلظت‌های مختلف عصاره آبی الكلی گل ریواس و عصاره آبی دانه رازیانه

از عصاره آبی گل ریواس غلظت‌های 100 ، 200 ، 250 و 300 میکروگرم بر میلی لیتر و از عصاره آبی رازیانه غلظت‌های 75 ، 150 ، 300 ، 600 و 800 میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. عصاره‌های رقیق شده به وسیله فیلتر سر سرنگی 0.22 میکرون با قطر 25 میلی متر ساخت سارتریوس آلمان استریل شد.

۴- کشت انگل تریکوموناس واژینالیس مورد مطالعه انگل تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس طی مطالعه حیدری و همکاران از ترشحات واژن زن مبتلا به تریکومونیازیس تهیه و در محیط TYIS33 کشت داده شد.

یافته ها:

تأثیر غلظت های مختلف عصاره آبی الکلی گیاه ریواس (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مجاورت با تکیاخته تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

۱- مقایسه تعداد انگل زنده شمارش شده در یک میلی لیتر با گروه شاهد، ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن غلظت های مختلف عصاره آبی الکلی ریواس:

تأثیر عصاره آبی الکلی گیاه ریواس در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۲۴ ساعت از مجاورت غلظت های موجود در جدول (۱) نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعداد انگل زنده در یک میلی لیتر $10^4 \times 52$ بوده است. با افزایش غلظت، اثر بازدارندگی عصاره آبی الکلی گیاه ریواس نیز افزایش یافت، به طوری که در غلظت ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب میانگین تعداد انگل زنده در یک میلی لیتر $10^4 \times 39$ و $10^4 \times 12$ گزارش شد و در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیچ انگلی زنده نماند.

۲- مقایسه تعداد انگل زنده شمارش شده در یک میلی لیتر با گروه شاهد، ۴۸ ساعت بعد از اضافه کردن غلظت های مختلف عصاره آبی الکلی ریواس:

تأثیر عصاره آبی الکلی گیاه ریواس در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۴۸ ساعت از مجاورت غلظت های موجود در مقایسه با گروه شاهد در جدول نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعداد انگل زنده در یک میلی لیتر $10^4 \times 12$ بوده است و با افزایش غلظت اثر کشنندگی عصاره آبی الکلی گیاه ریواس نیز افزایش یافته است، به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر میانگین تعداد انگل زنده در یک میلی لیتر $10^4 \times 7$ مشاهده شد و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیچ انگلی زنده نماند. (جدول ۱)

آنالیز واریانس داده ها نشان داد که در هر ۴ غلظت، عصاره آبی الکلی گیاه ریواس، مقایسه میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد دارای اختلاف معنی داری ($P < 0.001$) بود.

میکرولیتر برداشته شد و به میکروتیوب استریل ریخته و میکروتیوب ها در انکوباتور 37°C نگهداری شد، و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد انگل زنده موجود در هر میکروتیوب به کمک لام نتوبار شمارش شد و تمامی این مراحل ۳ بار تکرار شد. همچنین در هر بار آزمایش یک میکروتیوب حاوی انگل و محیط کشت به عنوان کنترل منفی و یک میکروتیوب حاوی انگل و محیط کشت که مترونیدازول به آنها اضافه شده بود، به عنوان کنترل مثبت اختصاص داده شد. لازم به ذکر است از مترونیدازول (Metronidazole 250-ABID) غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و به عنوان کنترل مثبت در هر سری آزمایش استفاده شد. بررسی لوله حاوی محیط پایه و انگل به عنوان کنترل منفی در هر سری تأثیر غلظت های مختلف عصاره ها، منظور می شد.

۶- شمارش انگل در لوله های میکروتیوب حاوی عصاره های گیاهان، لوله های کنترل مثبت و کنترل منفی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

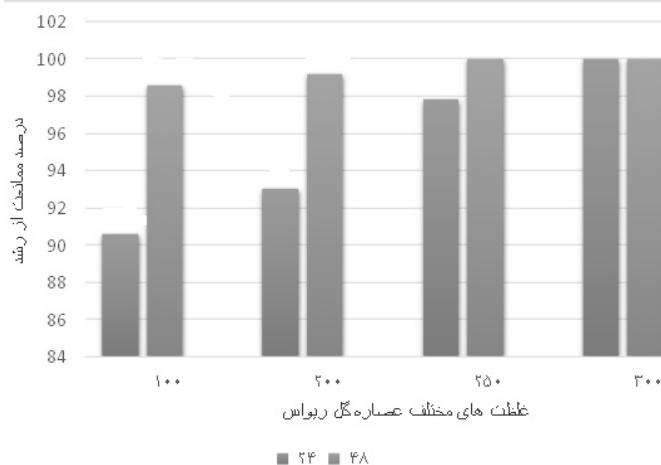
برای شمارش انگل، ۲۰ میکرولیتر محیط کشت با ۲۰ میکرولیتر رنگ حیاتی اوزین ۰/۱ مخلوط شد تا در مشاهده میکروسکوپی، انگل زنده و مرده از یکدیگر تفکیک شود. در انگل های مرده رنگ به یاخته نفوذ کرده و بدین ترتیب انگل ها صورتی رنگ مشاهده می شد. در حالی که انگل های فعال، زنده و متحرک رنگ اوزین را به خود جذب نمی کنند. برای کاهش خطأ، شمارش انگل در هر میکروتیوب ۵ بار و هر آزمایش نیز ۳ بار تکرار شد.

۷- محاسبه درصد ممانعت از رشد انگل (MIC) بررسی تأثیر عصاره ها بر روی تروفوزوئیت تریکوموناس (Minimum Inhibitory Concentration) بر اساس MIC (MIC) (Concentratin) صورت گرفت.

بدین منظور از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد عدم رشد انگل} = \frac{(\text{میانگین تعداد انگل زنده در گروه مورد} - \text{میانگین تعداد انگل زنده در گروه شاهد})}{\text{میانگین تعداد انگل زنده در گروه شاهد}} \times 100$$

گروه شاهد (کنترل منفی) شامل محیط کشت و انگل تریکوموناس واژینالیس است.



نمودار ۱: درصد ممانعت از رشد انگل ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گل ریواس

۴- عصاره آبی دانه گیاه رازیانه

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه رازیانه (۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مجاورت با تکیاخته تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

۵- مقایسه تعداد انگل زنده شمارش شده در یک میلی لیتر با گروه شاهد، ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره آبی دانه رازیانه:

تأثیر عصاره آبی گیاه رازیانه در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۲۴ ساعت پس از مجاورت غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد که در غلظت مذکور میانگین تعداد انگل زنده $10^4 \times 10^4$ است. در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، میانگین تعداد انگل زنده $10^4 \times 10^4$ گزارش شد. (جدول ۲)

۶- مقایسه تعداد انگل زنده شمارش شده در یک میلی لیتر با گروه شاهد، ۴۸ ساعت بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره آبی دانه رازیانه:

تأثیر عصاره آبی گیاه رازیانه در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۴۸ ساعت نشان داد که در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر میانگین تعداد انگل زنده $10^4 \times 10^4$ است و در غلظت‌های بالاتر نیز میانگین تعداد انگل زنده کاهش یافت، به طوری که

جدول شماره ۱: مقایسه تعداد انگل زنده شمارش شده در یک

میلی لیتر با گروه شاهد، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اضافه کردن

غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی ریواس

Pvalue	۴۸		۲۴		۳۰۰ غلظت عصاره آبی الکلی ریواس $\mu\text{g/ml}$
	ر ^۱ متفاوت زمان و غلظت	ر ^۲ غلظت	ر ^۳ کاهش تعداد انگل	ر ^۴ کاهش تعداد انگل	
۰.۰۱ <0.1	۰.۰۱ <0.1		۱۲±۱		۲ ۵۲±
۰.۰۱ <0.2	۰.۰۱ <0.2	۴۴	۷±۱	۲۵	۳۹±۴ ۲۰۰
۰.۰۱ <0.3	۰.۰۱ <0.3	۱۰۰	۰	۶۹	۱۲±۲ ۲۵۰
		.	.	.	۳۰۰
		۸۷۲±۶۶	۵۵۲±۳۲		شاهد
					منفی
<0.001	اثر متفاوت زمان و غلظت				

: مقایسه غلظت ۱۰۰ و $200 \mu\text{g/ml}$ از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

۲: مقایسه غلظت ۲۰۰ و $250 \mu\text{g/ml}$ از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

۳: مقایسه غلظت ۲۵۰ و $300 \mu\text{g/ml}$ از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

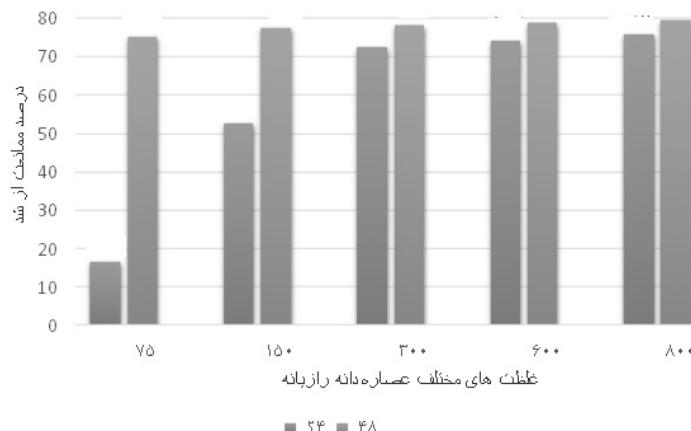
* داده‌ها $\times 10^4$ است.

۳- درصد ممانعت از رشد انگل

درصد ممانعت از رشد انگل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی گیاه ریواس در نمودار (۱) نشان داده شده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی ریواس در غلظت ۳۰۰ میلی گرم در میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت 100% درصد مانع از رشد تروفوزوئیت انگل می‌شود.

۷- درصد ممانعت از رشد انگل

درصد ممانعت از رشد انگل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی رازیانه در نمودار (۲) نشان داده شده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که عصاره آبی رازیانه در غلظت $800 \text{ میکروگرم بر میلی لیتر}$ پس از ۲۴ ساعت 76% درصد ممانع از رشد تروفوژیت انگل می‌شود.



نمودار ۲: درصد ممانعت از رشد انگل ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی دانه رازیانه

۸- مقایسه درصد ممانعت از رشد عصاره‌ها

در جدول (۳) مقایسه درصد بازدارندگی رشد عصاره آبی الکلی گل ریواس و آبی دانه رازیانه بر روی تریکوموناس واژینالیس نمایش داده شده است.

جدول ۳: مقایسه درصد بازدارندگی رشد عصاره‌های ریواس و رازیانه پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

غله	عصاره گیاهان	غلظت‌ها	ممانعت از رشد %	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت
عصاره آبی الکلی گل ریواس $\mu\text{g}/\text{ml}$	عصاره آبی	۱۰۰	۹۹	۹۱	۹۹
	الکلی گل	۲۰۰	۹۹	۹۳	۹۹
	ریواس	۲۵۰	۱۰۰	۹۸	۱۰۰
		۳۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
عصاره آبی دانه رازیانه $\mu\text{g}/\text{ml}$	عصاره آبی	۷۵	۷۵	۱۶	۹۹
	عصاره آبی	۱۵۰	۷۷	۵۳	۹۹
	دانه رازیانه	۳۰۰	۷۸	۷۳	۱۰۰
		۶۰۰	۷۹	۷۴	۹۸
		۸۰۰	۷۹	۷۶	۹۹

در غلظت $800 \text{ میکروگرم بر میلی لیتر}$ ، میانگین تعداد انگل زنده 179×10^4 گزارش شد.

آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که در هر ۵ غلظت عصاره آبی گیاه رازیانه مقایسه میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.001$) بود. جالب آنکه در غلظت ۳۰۰ تا $800 \text{ میکروگرم در میلی لیتر}$ ، میانگین تعداد انگل در یک میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت بیشتر از میانگین انگل زنده در یک میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت بود. که به نظر می‌آید تأثیر عصاره در طی زمان بر روی انگل کاهش یافته است. با توجه به داده‌های جدول (۲) اختلاف معناداری در بین میانگین تعداد انگل زنده وجود دارد، ولی درصد کاهش تعداد انگل زنده از غلظت ۳۰۰ تا $800 \text{ میکروگرم در میلی لیتر}$ پشمگیر نبوده است. بنابراین از تأثیر غلظت‌های بالاتر از $800 \text{ میکروگرم در میلی لیتر}$ صرفه نظر شد.

جدول ۲: مقایسه تعداد انگل زنده شمارش شده در یک میلی لیتر با گروه شاهد، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره آبی دانه گیاه رازیانه

غلظت عصاره آبی دانه گیاه رازیانه $\mu\text{g}/\text{ml}$	اثر متقابل زمان و غلظت	P-Value		۴۸	۲۴
		زیستگی زمان و غلظت:	زیستگی غلظت:	زیستگی کاهش تعداد انگل زنده در ۱ml*	زیستگی کاهش تعداد انگل زنده در ۱ml*
۷۵	<0.0011	<0.0011		215 ± 12	461 ± 18
۱۵۰	<0.0012	<0.0012	۸/۸	196 ± 12	261 ± 19
۳۰۰	<0.0013	<0.0013	۳	189 ± 6	42 ± 5
۶۰۰	<0.0014	<0.0014	۲	185 ± 11	142 ± 11
۸۰۰			۳	179 ± 7	132 ± 36
شاهد				872 ± 66	552 ± 32
	<0.001	<0.001			

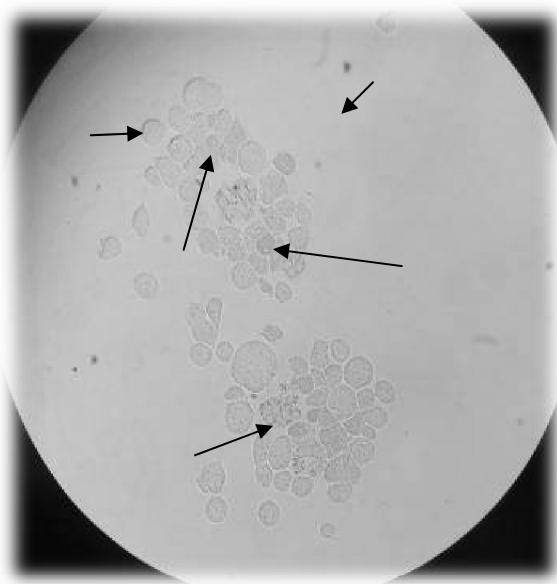
۱: مقایسه غلظت ۷۵ و 150 µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

۲: مقایسه غلظت ۱۵۰ و 300 µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

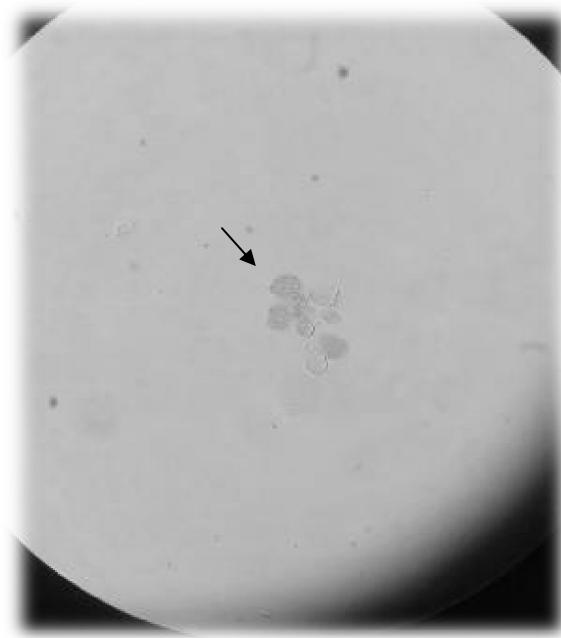
۳: مقایسه غلظت ۳۰۰ و 600 µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

۴: مقایسه غلظت ۶۰۰ و 800 µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

* داده‌ها $\times 10^4$ است.



تصویر ۳: تروفوزویت تریکوموناس واژینالیس مرد پس از تاثیر عصاره، رنگ شده با ائوزین

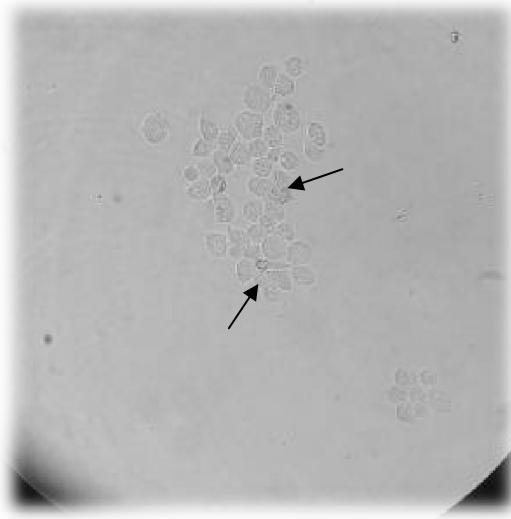


تصویر ۱: تروفوزویت تریکوموناس واژینالیس مرد پس از تاثیر عصاره، رنگ شده با ائوزین

بحث و نتیجه گیری:

یافته‌های این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه ریواس به طور معنی‌داری سبب کاهش میانگین تعداد انگل زنده بر حسب زمان و غلظت شد. اثر بازدارندگی عصاره آبی الکلی گیاه ریواس ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مجاورت با تکیاخته تریکوموناس واژینالیس در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب، ۹۷/۸ درصد و ۱۰۰ درصد بود. درصد ممانعت از رشد انگل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دانه گیاه رازیانه نیز بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ۷۶ درصد اثر بازدارندگی از رشد انگل در زمان ۲۴ ساعت ردیابی شد و در زمان ۴۸ ساعت، ۷۹/۴ درصد قدرت بازدارندگی گزارش شد.

تریکومونیازیس شایع ترین بیماری غیر ویروسی قابل انتقال از راه تماس جنسی است. این بیماری که توسط تکیاخته بیماری‌زای تریکوموناس واژینالیس به وجود می‌آید باعث صدمات و عوارضی از قبیل: زایمان زودرس، تولد نوزادان کم‌وزن و سقط جنین می‌شود. درمان رایج این بیماری مترونیدازول است که دارای عوارض جانبی از جمله سردرد، ضعف، بی خوابی، التهاب معده، سرگیجه، تهوع، استفراغ، خشکی دهان، طعم فلزی در دهان، وزوزکردن گوش،



تصویر ۲: تروفوزویت تریکوموناس واژینالیس مرد پس از تاثیر عصاره، رنگ شده با ائوزین

از گیاهان مؤثر علیه تریکوموناس واژینالیس در تحقیق حاضر عصاره هیدروالکلی ریواس بود. حداقل غاظت بازدارندگی گل ریواس بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و بعد از گذشت ۴۸ ساعت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد. ریواس در طب سنتی برای تقویت معده و کبد، کاهش تب، رفع بی‌اشتهاای و درمان یرقان مطرح است و همچنین به عنوان فعال‌کننده عملکرد دستگاه گوارش، ناقل نمک‌های صفراءوی و محرك ترشح کبد شناخته شده است. نخستین کارکرد آن در دهان این است که با تحریک اعصاب دهان به واسطه مزء تلخ که دارد، موجب پاک شدن حفره دهان از میکروب‌ها می‌شود و نیز دارای اثرات ضد انگلی نیز هست. (۲۲ و ۲۳) ترکیبات گیاه ریواس عبارت‌اند از: هیدروکربن‌هایی با زنجیره بلند (۸۰/۱٪)، تریکوزان (۲۶/۲۹٪)، پتاکوزان (۲۶/۰۷٪)، hrneicosane (۳/۶۴٪)، تاننoides (۱۰/۶۳٪)، هپتاکوزان (۱۰/۳۷٪)، اسد پالمتیک (۱۰٪)، تاننoides (۱۰/۶۳٪)، گلوکریدها، گلوکوگالوزید (Ac. Tetraroside اسید گالیک آزاد، اسید کریزوфанیک Emodin (Emodol (Chrysophanique) و امودین (Emodin

(Ac.) است. به نظر می‌آید که این ترکیبات اثرات ضد میکروبی دارند. در مطالعه‌ای که توسط فضلی بزا و همکاران در سال ۱۳۸۴ در مشهد انجام شد، نشان داد عصاره هیدروالکلی ریشه ریواس در غاظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر دارای ۱۰۰ درصد بازدارندگی بر تریکوموناس واژینالیس است. (۲۴) در مطالعه حاضر غاظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سبب از بین رفتن ۱۰۰ درصد انگل بعد از ۲۴ ساعت شد. لازم به توضیح است که فضلی و همکاران از ریشه ریواس جهت انجام تحقیق استفاده کرند، در حالی که در مطالعه حاضر از گل ریواس جهت تهیه عصاره استفاده شد. تفاوت غاظت مؤثر در از بین بردن انگل شاید به ترکیبات مختلف در قسمت‌های متفاوت گیاه مربوط باشد. آنالیز آماری نیز روند کاهش معنی دار انگل را در طی زمان و غاظت مجاورت تأیید کرد. آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که در هر ۴ غاظت عصاره آبی الکلی گیاه ریواس مقایسه میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد

مورمورشدن بدن، راش پوستی، ادرار تیره و سوزش ادرار است. (۲۵) داروی مترونیدازول در باکتری‌ها جهش‌زا و در حیوانات آزمایشگاهی کارسینوژن بوده و نیز سبب تضعیف سیستم ایمنی هموزال و سلولار می‌شود. همچنین گزارش‌های زیادی از بسیاری از کشورها مبنی بر شیوع مقاومت به مترونیدازول و عوارض کارسینوژنیک آن، پژوهشگران را بر آن داشته‌اند تا به جستجوی داروهای جایگزین بپردازنند. (۷) گیاهان دارویی از گذشته به صورت گسترده در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند. این استفاده گسترده می‌تواند به دلایل مختلفی چون مزیت کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار به علت توصیه طب سنتی و استفاده نسل‌های گذشته و یا قیمت کمتر گیاهان دارویی باشد. اثرات درمانی گیاهان دارویی بیشتر با عملکرد فیزیولوژیک طبیعی بدن انسان سازگاری بیشتری دارد. به همین جهت، استفاده از داروهای گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که نکته مهم در مطالعات دارویی، میزان توکسیک بودن دارو بر سلول‌های بدن است و مترونیدازول دارای اثرات توکسیک بر سلول‌های سالم علاوه بر انگل است (۱۸ و ۲۰ و ۲۱)، در حالی که گیاهان دارویی نه تنها دارای حداقل اثرات جانبی هستند، بلکه می‌توانند در تقویت سیستم‌های دیگر بدن نقش داشته باشند. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر ضد میکروبی عصاره برخی گیاهان وجود دارد. از آن جایی که احتمال دارد این گیاهان نقش مؤثری در کنترل بیماری‌ها داشته باشند، ارزیابی دقیق گیاهان دارویی ضروری به نظر می‌رسد. بسیاری از داروهایی شناخته شده و معروف دارای منشأ گیاهی هستند. برای مثال، کینین که از پوست درخت گنه تهیه می‌شود و در درمان مalaria به کار می‌رود دارای مشتقات سنتیک زیادی همچون کلروکین، آمودیاکین و پریماکین است. در نهایت افزایش تقاضا برای داروهای طبیعی ممکن است به یافتن داروهای ضد انگلی جدیدی منجر شود که دارای حداقل اثرات جانبی باشند. مکانیسم اثر مترونیدازول که به عنوان داروی سنتیک ضد آمیب، زیارديا و تریکوموناس واژینالیس به کار می‌رود شکستن زنجیره‌های DNA است که گاه باعث اثرات جانبی خطناکی بر روی میزان نیز می‌شود. (۲۱)

نتایج حکایت از تأثیر منطقه رویش گیاه، به ویژه نوع عصاره مورد استفاده دارد، که به دنبال آن تفاوت در مواد موجود در عصاره را سبب می‌شود. لازم به توضیح است که در عصاره گیاه رازیانه آنتول Anethol به مقدار ۵۰ تا ۷۰ درصد مشاهده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیب در اثر حرارت از عصاره‌ها خارج می‌شود. بنابراین شاید تأثیر اندک عصاره آبی دانه رازیانه بر تریکوموناس واژینالیس به دلیل حضور کم ترکیب آنتول باشد. باتوجه به نتایج بهدست آمده در بین دو گیاه مورد مطالعه (ریواس، رازیانه) بهترین اثر ممانعت از رشد انگل تریکوموناس واژینالیس در مدت زمان ۲۴ ساعت در گل ریواس مشاهده شد. این پژوهش به روشنی نشان داد، اثر ضد انگلی عصاره آبی الکلی گیاه ریواس، از عصاره آبی گیاه رازیانه بیشتر است. مطالعات بعدی در خصوص جداسازی مواد مؤثره ریواس بر انگل مذکور و تحقیقات *in vivo* انسان جهت استفاده آنها ضروری است.

تقدیر و تشکر:

از سرکار خانم خانم دکتر زبردست و دکتر نیلوفر تقی‌پور و سرکار خانم دکتر معماری و آقای بهروان به دلیل نظرات ارزشمندانه تشكر و قدردانی می‌شود. از حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمی‌سیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (با شماره ۱۷۶ / ۴۲۲) قدردانی می‌شود.

دارای اختلاف معنی دار $P < 0.001$ بود. در این تحقیق از دیگر عصاره‌های مورد استفاده عصاره آبی دانه گیاه رازیانه بود. اجزای مختلف گیاه رازیانه خواص متعددی دارد از جمله ریشه رازیانه، اثر مدر قوی دارد. برگ قاعده‌آور است. میوه رازیانه، اثر نیرودهنده، مقوی معده، اشتها آور، آرام‌کننده، قاعده‌آور، زیاد‌کننده ترشحات شیر و بادشکن دارد. ریشه رازیانه به علت مدر بودن، در موارد دفع ادرار، دفع سنگ کلیه، نفریت و بیماری‌های نظیر آن مصرف می‌شود. میوه رازیانه دارای ۱۲ درصد روغن است. به علاوه شامل ماده قندی، موسیلاز و اسانس به مقدار ۴ تا ۶ درصد است. اسانس رازیانه شامل: آنتول Anethol به مقدار ۵۰ تا ۷۰ درصد، استراگول Estagol آنزیک Ald Anisique، فنون راست Fenone به مقدار ۱۰ تا ۲۰ درصد، کامفن Dipenthene، دیپانتن Camphene، آلفا فلاندرن Phellandrene α و غیره است. (۲۵) نتایج بهدست آمده نشان داد که در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۷۶ درصد اثر بازدارندگی از رشد انگل در زمان ۲۴ ساعت و در زمان ۴۸ ساعت ۷۹/۴ درصد قدرت بازدارندگی گزارش شده است. نتایج نشان دادند اختلاف معناداری در بین میانگین تعداد انگل زنده وجود دارد، ولی درصد کاهش تعداد انگل زنده از غلظت ۳۰۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر چشمگیر نبود. نائینی و همکاران به بررسی اثرات ضدکاندیدایی وایمونومولاکتوری اسانس و عصاره‌های گیاه رازیانه (Foeniculum Vulgare Mill) در شرایط آزمایشگاهی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که گیاهان رازیانه خاصیت بازداردگی متوسطی بر روی کاندیدا آلبیکانس دارند. (۲۶) این

References:

1. Wolner-Hanssen P, Krieger JN, Stevens CE, Kiviat NB, Koutsky L, DeRouen T et al. Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *JAMA* 1989 ; 261: 571–76.
2. Van Schalkwyk J, Yudin MH, Yudin MH, Allen V, Bouchard C, Boucher M et al. Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis.; *J Obstet Gynaecol Can* 2015; 37(3):266-74
3. Hezarjaribi HZ, Fakhar M, Shokri A, Teshnizi SH, Sadough A, Taghavi M. Trichomonas vaginalis infection among Iranian general population of women: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res* 2015; 114(4):1291-300.
4. Šoba B, Skvarč M, Matičič M. Trichomoniasis: a brief review of diagnostic methods and our experience with real-time PCR for detecting infection. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2015;24(1):7-10
5. Swygard H, Miller WC, Kaydos-Daniels SC, Cohen MS, Leone PA, Hobbs MM, Sena AC. Targeted screening for Trichomonas vaginalis with culture using a two-step method in women presenting for STD evaluation. *Sex Transm Dis* 2004; 31(11): 659 – 66.
6. Rasti S, Taghriri A, Behrashi M. Trichomoniasis in women referring to shabikhani hospital in Kashan. *Feyz J* 2002; 7(26): 21-5.
7. Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis-an emerging problem. *N Engl J Med* 1999;341(4):292-93.
8. Marjorie MC. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:564-82.
9. Mosaddegh M, Naghibi FI. Traditional Medicine: Past & Present. *Traditional Medicine & Materia medica*. Vol. 1. Tehran, Iran; Published TMRC 2002; p: 2-20.
10. Muelas-Serrano S, Nogal JJ, Martínez-Díaz RA, Escario JA, Martínez-Fernández AR, Gómez-Barrio A. In vitro screening of american plant extracts on Trypanosoma cruzi and Trichomonas vaginalis. *J Ethnopharmacol* 2000; 71(1-2): 101-7.
11. Taran M, Rezaeian M, Izaddost M. In vitro antitrichomonas activity of Allium hirtifolium (Persian shallot) in comparison with metronidazole. *Iranian J Pub Health* 2006; 35: 92-94.
12. Khalilidehkordi B, Rafieyan M, Hejazi SH, Yusefi HA, Yektaeeian N, Shiranibidabadi L. In vitro antitrichomonas activity of extracts of Artemisia absinthium and Achillea millefolium and Juglans regia. *J Shahrekord Univ Med Sci* 1389;12(4):62-9.
13. Saeedi M, Ebrahimzadeh MA, Morteza-Semnani K, Akha A, Rabiei KH. Evaluation of Antibacterial Effect of Ethanolic Extract of Foeniculum Vulgare Mill. *J Mazand Univ Med Sci* 2010; 20(77): 88-91.
14. Abu-Darwish MS, Al-Ramamneh EA, Kyslychenko VS, Karpiuk UV. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region - South of Jordan. *Pak J Pharm Sci* 2012; 25(1):239-46.
15. Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res*. 1996 Aug; 13(8): 1133-44.
16. Samsum shariat H. Extraction of effective substance from drug plants. 2nd ed. Esfahan: Manni; 1386, 12-20.
17. Heidari S, Bandehpour M, Seyyed-Tabaei SJ, Valadkhani Z, Haghghi A, Abadi A, Kazemi B Ferredoxin Gene Mutation in Iranian Trichomonas vaginalis Isolates. *Iran J Parasitol*. 2013 8(3):402-7.

18. Dashtpema A, Moshfea AA, Manzoori L, Arefkhah N, Shahriyari S, Mohseni M, Abasi M, Noshadian . Effect of babooneh on recovery from cutaneous leishmaniasis due to *L.majour* in balbc mice. Armaghan danesh. 20.2 (97)
19. Gehring S, Efferth T. Development of Drug Resistance in *Trichomonas vaginalis* and its Overcoming with Natural Products. The Open Bioactive Compounds Journal 2009; 2:21-8
20. Marjorie MC. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microb Rev 1999; 12:564-82.
21. Mahmoudi R, Ehsani A, Tajik H, Akhonzade Bastiand A, Khosrowshahi A Antimicrobial effects of *Mentha Longifolia L.* Essential oil and *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus aureus* in Iranian White Cheese. J of nut sci 2010; 1(20): 148-61.
22. Gehring S, Efferth T. Development of Drug Resistance in *Trichomonas vaginalis* and its Overcoming with Natural Products. The Open Bioactive Compounds Journal 2009; 2:21-8
23. Zargari A. Medicinal Plants, Vol.2, 5th ed. Tehran: Tehran University publication, 1991. (Text in Persian).
24. Fazli B. In vitro survey of *Rheum nobile* on *Trichomonas vaginalis*. Mashhad University.1384. (Text in Persian).
25. Marjorie MC. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microb Rev 1999; 12:564-82.
26. Naeini AR, Khosravi AR, Tajbkhsh H, Ghazanfari T, Yaray R. Invitro survey of anticandida and immunomedulatory effect of esanse and extract of *Foeniculum Vulgare* Mill. J Shaheed Univ Med Sci 1388;16(82).