

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

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

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

چکیده

سابقه و هدف: تریکومونیاژیس یکی از بیماری‌های شایع غیر ویروسی دستگاه ادراری - تناسلی است که توسط تازکدار تریکوموناس واژینالیس ایجاد می‌شود. مترونیدازول و تینیدازول دو داروی انتخابی در درمان تریکومونیاژیس هستند، اما سرطان‌زایی بالقوه، اثرات تراتوژنیک بر جنین و مقاومت این ارگانیزم به مترونیدازول گزارش شده است. باتوجه به اثرات سایتوتوکسیک گیاهان دارویی از جمله ریواس و رازیانه بر ارگانیزم‌های 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 ۳۰۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و از عصاره آبی دانه رازیانه غلظت‌های ۸۰۰-۷۵ 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 کنار گروه‌های کنترل مثبت مترونیدازول و کنترل 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 به‌دست 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:

بیماری‌زای تریکوموناس واژینالیس به‌وجود می‌آید. تظاهرات بالینی تریکومونیاژیس در زنان شامل طیف گسترده‌ای از علائم شامل التهابات شدید، خارش، ترشحات فراوان کف‌آلود،

تریکومونیاژیس شایع‌ترین بیماری غیر ویروسی قابل انتقال از راه تماس جنسی است. این بیماری توسط تک‌یاخته

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 تریکومونیاپی چند گونه گیاهی از جمله موسیر، بومادران، برگ گردو، افسنتين در سال‌های اخیر گزارش شده است (۱۰-۱۲). رازیانه با نام علمی

Rheum Foeniculum vulgare و ریواس با نام علمی *Rheum 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 هم‌خانواده 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 سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سرئوس (۱۳، ۱۴، ۱۵) بیانگر مؤثر بودن احتمالی این گیاهان بر روی میکروارگانیسم‌های دیگر از جمله تریکوموناس واژینالیس است.

هدف این تحقیق باتوجه 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 تریکومونیاپی 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 کمالی‌نژاد، 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 آلودگی‌های زیاد هم علامتی دیده نمی‌شود. (۱) عوارض مرتبط با تریکومونیاپی در زنان شامل زایمان زودرس، تولد نوزادان کم‌وزن، سقط جنین، پارگی زودرس کیسه آب، حاملگی خارج رحم، اندومتریت پس از زایمان، سالپنژیت، سرویسیت مزمن، سرطان سرویکس و نازایی برگشت‌پذیر است و در مردان شامل پروستاتیت، التهاب اپیدیدیم، اورتریت، بیماری‌های اوترال و حتی ناباروری است. (۲ و ۳) این تاژکدار نقش بالقوه‌ای در ابتلاء به عفونت‌های ثانویه مانند ویروس پاپیلوما‌ی انسانی دارد و بروز سرطان 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 تریکومونیاپی مترونیدازول و تینیدازول است، اما در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر کارسینوزن بودن این داروها و همچنین موارد مقاومت دارویی نسبت به مترونیدازول گزارش شده است. (۷) اینگونه موارد ضرورت یافتن داروی جایگزین را برای درمان تریکومونیاپی 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 کم‌خطر، در دسترس و ارزان‌قیمت، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک، در درمان عفونت‌های میکروبی بوده است. همچنین داروهای

۲- تهیه عصاره هیدروالکلی از گل گیاه ریواس

(Rheum ribes) و آبی رازیانه (Foeniculum vulgare)

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 الکل اتیلیک و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب به آن اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت محتویات 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 مقطر که جوش آمده اضافه شد، و سریع ظرف از روی حرارت برداشته شد، پس از گذشت ۴ ساعت محتویات 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 ۰/۰۰۱ 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 الکی گل

ریواس و عصاره آبی دانه رازیانه

از عصاره آبی گل ریواس غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و از عصاره آبی رازیانه غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. عصاره‌های رقیق شده به وسیله فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرون با قطر ۲۵ 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 تریکومونیاژیس تهیه و در محیط TYIS33 کشت داده شد.

(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 $40\times$ بررسی شد. به منظور شمارش انگل، لوله محیط کشت TYI-S-33 حاوی انگل بعد از فاز لوگاریتمی (۷۲-۴۸ 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:

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

X: میانگین تعداد انگل در مربع‌های ۱۶ خانه‌ای

Y: عکس فاکتور رقت

۱۰۴: تبدیل حجم mm^3 ۱/۰، به cm^3 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

یافته ها:

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی گیاه ریواس (۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ 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 غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی ریواس:

تأثیر عصاره آبی الکلی گیاه ریواس در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۲۴ ساعت از مجاورت غلظت‌های موجود در جدول (1) نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعداد انگل زنده در یک میلی لیتر 1.04×10^4 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 1.04×10^4 و 3.9×10^4 و 1.2×10^4 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 غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی ریواس:

تأثیر عصاره آبی الکلی گیاه ریواس در شرایط آزمایشگاهی بعد از ۴۸ ساعت از مجاورت غلظت‌های 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، 1.2×10^4 بوده است و با افزایش غلظت اثر کشندگی 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 1.04×10^4 مشاهده شد و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیچ انگلی زنده نماند. (جدول 1)

آنالیز واریانس داده‌ها 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 میکروتیوب‌ها در انکوباتور 37°C نگهداری شد، و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد انگل زنده موجود در هر میکروتیوب به کمک لام نئوبار 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 متروئیدازول به آنها اضافه شده بود، به عنوان کنترل مثبت اختصاص داده شد. لازم به ذکر است از متروئیدازول (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 غلظت‌های مختلف عصاره‌ها، منظور می‌شد.

۶- شمارش انگل در لوله‌های میکروتیوب حاوی عصاره‌های گیاهان، لوله‌های کنترل مثبت و کنترل منفی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

برای شمارش انگل، ۲۰ میکرولیتر محیط کشت با ۲۰ میکرولیتر رنگ حیاتی اتوزین ۰/۱ مخلوط شد تا در مشاهده میکروسکوپی، انگل زنده و مرده از یکدیگر تفکیک شود. در انگل‌های مرده رنگ به یاخته نفوذ کرده و بدین ترتیب انگل‌ها صورتی‌رنگ مشاهده می‌شد. در حالی که انگل‌های فعال، زنده و متحرک رنگ اتوزین را به خود جذب نمی‌کنند. برای کاهش خطا، شمارش انگل در هر میکروتیوب ۵ بار و هر آزمایش نیز ۳ بار تکرار شد.

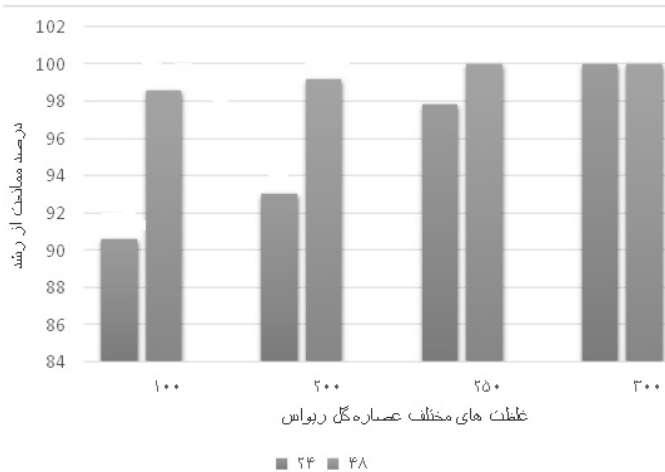
۷- محاسبه درصد ممانعت از رشد انگل (MIC)

بررسی تأثیر عصاره‌ها بر روی تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس بر اساس (Minimum Inhibitory MIC Concentration) صورت گرفت.

بدین منظور از فرمول زیر استفاده شد:

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

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 $104 \times$ ۴۶۱ است. در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، میانگین تعداد انگل زنده $104 \times$ ۱۳۲ 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 $104 \times$ ۲۱۵ 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 الکی ریواس

Pvalue	۴۸		۲۴		غلظت عصاره آبی الکی ریواس $\mu\text{g/ml}$
	در صد کاهش تعداد انگل زنده	انگل	در صد کاهش تعداد انگل زنده	تعداد انگل زنده در 1ml^*	
اثر متقابل زمان و غلظت	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۱۰۰
	<۰/۱	<۰/۱	۱۲±۱	۲	۵۲±
	۰/۱	۰/۱	۴۴	۲۵	۳۹±۴
	<۰/۲	<۰/۲	۷±۱	۶۹	۱۲±۲
	۰/۱	۰/۱	۱۰۰	۰	۰
	<۰/۳	<۰/۳	۰	۰	۰
			۰	۰	۰
			۸۷۲±۶۶	۵۵۲±۳۲	شاهد منفی
			اثر متقابل زمان و غلظت		
	<۰/۰۰۱				

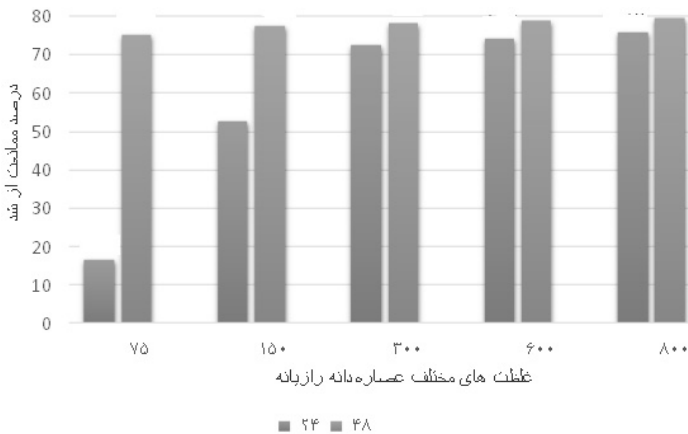
۱: مقایسه غلظت ۱۰۰ و $200\mu\text{g/ml}$ از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری
 ۲: مقایسه غلظت ۲۰۰ و $250\mu\text{g/ml}$ از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری
 ۳: مقایسه غلظت ۲۵۰ و $300\mu\text{g/ml}$ از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری
 * داده‌ها $104 \times$ است.

۳- در صد ممانعت از رشد انگل

درصد ممانعت از رشد انگل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکی 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 ۱۰۰ 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 (2) نشان داده شده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که عصاره آبی رازیانه در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت ۷۶ درصد و پس از ۴۸ ساعت ۷۹/۴ درصد مانع از رشد تروفوزوئیت 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 وازینالیس نمایش داده شده است.

جدول ۳: مقایسه درصد بازدارندگی رشد عصاره‌های ریواس و

رازیانه پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

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

در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، میانگین تعداد انگل زنده 104×179 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 ۸۰۰ 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. باتوجه به داده‌های جدول (۲) 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 نبوده است. بنابراین از تأثیر غلظت‌های بالاتر از ۸۰۰ 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 گیاه رازیانه µg/ml	۲۴		۴۸		P-Value
	تعداد انگل زنده در ۱ml*	درصد کاهش تعداد انگل زنده	تعداد انگل زنده در ۱ml*	درصد کاهش تعداد انگل زنده	
۷۵	۶۷۱±۱۸		۲۱۵±۱۲		<0.0011
۱۵۰	۲۶۱±۱۹	۴۳	۱۹۶±۱۲	۸/۸	<0.0012
۳۰۰	۱۵۱±۵	۴۲	۱۸۹±۶	۳	<0.0013
۶۰۰	۱۴۲±۱۱	۶	۱۸۵±۱۱	۲	<0.0014
۸۰۰	۱۳۲±۳۶	۷	۱۷۹±۷	۳	
شاهد	۵۵۲±۳۲		۸۷۲±۶۶		
اثر متقابل زمان و غلظت					
					<0.001

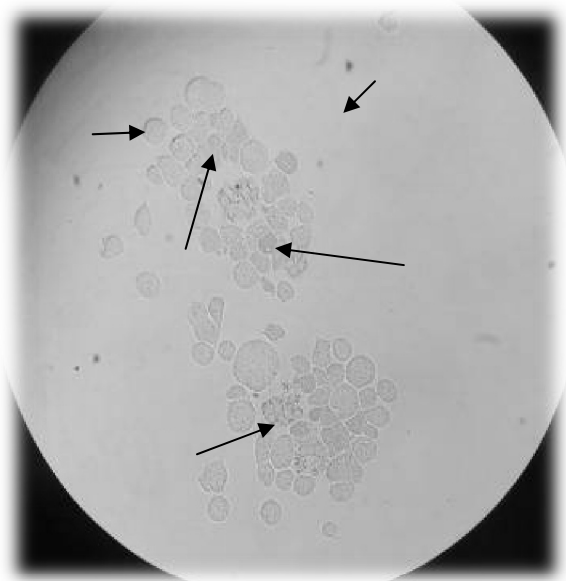
۱: مقایسه غلظت ۷۵ و ۱۵۰ µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

۲: مقایسه غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

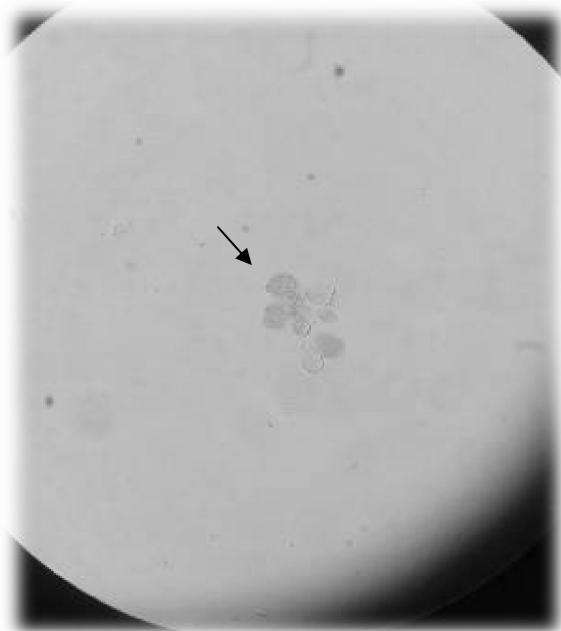
۳: مقایسه غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

۴: مقایسه غلظت ۶۰۰ و ۸۰۰ µg/ml از طریق تحلیل اندازه‌های تکراری

* داده‌ها $104 \times$ است.



تصویر ۳: تروفوزویت تریکوموناس واژینالیس مرده پس از تأثیر عصاره، رنگ شده با ائوزین

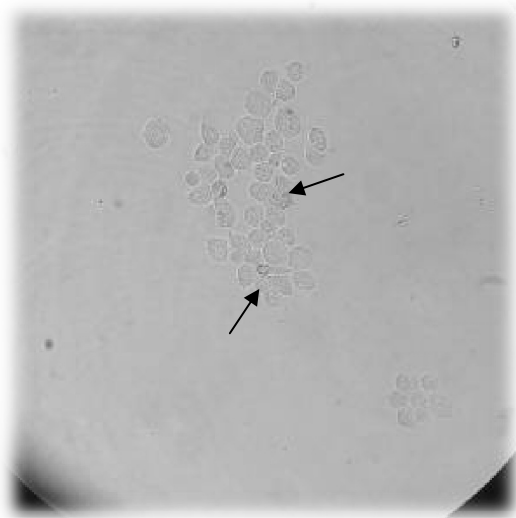


تصویر ۱: تروفوزویت تریکوموناس واژینالیس مرده پس از تأثیر عصاره، رنگ شده با ائوزین

بحث و نتیجه گیری:

یافته‌های این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه ریواس به طور معنی‌داری سبب کاهش میانگین تعداد انگل زنده برحسب 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. درصدهای ممانعت از رشد انگل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دانه گیاه رازیانه نیز بررسی شد. نتایج به‌دست 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.

تریکومونیاژیس شایع‌ترین بیماری غیر ویروسی قابل انتقال از راه تماس جنسی است. این بیماری که توسط تک‌یاخته بیماری‌زای تریکوموناس واژینالیس به‌وجود 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، بی‌خوابی، التهاب معده، سرگیجه، تهوع، استفراغ، خشکی دهان، طعم فلزی در دهان، و زوزکردن گوش،



تصویر ۲: تروفوزویت تریکوموناس واژینالیس مرده پس از تأثیر عصاره، رنگ شده با ائوزین

از گیاهان مؤثر علیه تریکوموناس واژینالیس در تحقیق حاضر عصاره هیدروالکلی ریواس بود. حداقل غلظت 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 بی‌اشتهایی و درمان یرقان مطرح است و همچنین به عنوان فعال‌کننده عملکرد دستگاه گوارش، ناقل نمک‌های صفراوی و محرک ترشح کبد شناخته شده است. نخستین کارکرد آن در دهان این است که با تحریک اعصاب دهان به واسطه مزه 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 (%۸۰/۸۱)، تریکوزان (%۲۶/۲۹) hrneicosane، پنتاکوزان (%۱۰/۶۳)، هپتاکوزان (%۱۰/۳۷)، اسد پالمیتیک (%۳/۶۴)، تان نوئیدهای (Tannoides)، گلوکزیدها، گلوکوالوزید Glucogalloside، تترارین Tetrarine یا تتراروزید Tetrarose، اسید گالیک آزاد، اسید کریزوفانیک (Ac. Chrysophanique) و امودین Emodin یا امودول (Emodol) است. به نظر می‌آید که این ترکیبات اثرات ضد میکروبی دارند. در مطالعه‌ای که توسط فضل‌ی بزاز و همکاران در سال ۱۳۸۴ در مشهد انجام شد، نشان داد عصاره هیدروالکلی ریشه ریواس در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر دارای ۱۰۰ درصد بازدارندگی بر تریکوموناس واژینالیس است. (۲۴) در مطالعه حاضر غلظت 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 کردند، در حالی که در مطالعه حاضر از گل ریواس جهت تهیه عصاره استفاده شد. تفاوت غلظت مؤثر در از بین بردن انگل شاید به ترکیبات مختلف در قسمت‌های متفاوت گیاه مربوط باشد. آنالیز آماری نیز روند کاهش معنی‌دار انگل را در طی زمان و غلظت مجاورت تأیید کرد. آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که در هر ۴ غلظت عصاره آبی الکلی گیاه ریواس مقایسه میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد

مورمورشدن بدن، راش پوستی، ادرار تیره و سوزش ادرار است. (۳) داروی مترونیدازول در باکتری‌ها جهش‌زا و در حیوانات آزمایشگاهی کارسینوژن بوده و نیز سبب تضعیف سیستم ایمنی همورال و سلولار می‌شود. همچنین گزارش‌های زیادی از بسیاری از کشورها مبنی بر شیوع مقاومت به مترونیدازول و عوارض کارسینوژنیک آن، پژوهشگران را بر آن داشته تا به جستجوی داروهای جایگزین بپردازند. (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 ۱۹ و ۲۰)، 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 داروهای شناخته شده و معروف دارای منشأ گیاهی هستند. برای مثال، کینین که از پوست درخت گنه تهیه می‌شود و در درمان مالاریا به کار می‌رود دارای مشتقات سنتتیک 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 سنتتیک ضد آمیب، ژیاودیبا و تریکوموناس واژینالیس به کار می‌رود شکستن زنجیره‌های DNA است که گاه باعث اثرات جانبی خطرناکی بر روی میزبان نیز می‌شود. (۲۱)

دارای اختلاف معنی‌دار $P < 0/001$ 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، اشتهاآور، 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، موسیلاژ و اسانس به مقدار ۴ تا ۶ درصد است. اسانس رازیانه شامل: آنتول Anethol به مقدار ۵۰ تا ۷۰ درصد، استراگول Estagol، متیل اوژنول Methyleugenol، ال‌دی‌دواستن آنیزیک Ald Anisique، فنون راست Fenone به مقدار ۱۰ تا ۲۰ درصد، کامفن Camphene، دیپانتن Dipentene، آلفا فلاندرن α Phellandrene 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 وایمونومدولاتوری اسانس و عصاره‌های گیاه رازیانه (Foeniculum Vulgare Mill) در شرایط آزمایشگاهی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که گیاهان رازیانه خاصیت بازدارندگی متوسطی بر روی کاندیدا آلبیکانس دارند. (۲۶) این

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 الکی گیاه ریواس، از عصاره آبی گیاه رازیانه بیشتر است. مطالعات بعدی در خصوص جداسازی مواد مؤثره ریواس بر انگل مذکور و تحقیقات *in vivo* در انسان جهت استفاده آنها ضروری است.

تقدیر و تشکر:

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

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 shabihkhani 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 Microb 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, Yektaeian 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. Samsun 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 baboonh 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 aur eus* 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. Naeeni 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).