

The effect of lavender essential oil and nanoemulsion on *Trichomonas vaginalis* in vitro

Ziae Hezarjaribi H¹, Nadeali N², Saeedi M³, Soosaraei M², Jorjani O⁴, Momeni Z⁵, Fakhar M^{1*}

1- Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Parasitology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I. R. Iran.

2- Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I. R. Iran.

3- Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I. R. Iran.

4- Laboratory Sciences Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I. R. Iran.

5- Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, I. R. Iran.

Received October 31, 2016; Accepted July 4, 2017

Abstract:

Background: *Trichomonas vaginalis* is the cause of trichomoniasis. Due to increased resistance and side effects of the drugs, the aim of this study was to assess an anti-trichomonias effect of lavender (*Lavandula officinalis*) essential oil and nanoemulsion on *T. vaginalis* in vitro.

Materials and Methods: Lavender essential oil components were characterized by gas chromatography. To determine the cytotoxicity effects, the macrophage cell line J774.A.1 was used. *Trichomonas vaginalis* was isolated from vaginal secretions of the infected women and then cultured in the TYM complete medium and passaged for 10 days. The effect of essential oil and 1% lavender nanoemulsion in concentrations 10, 25, 50 and 100 µg/mL in the 24-well plate were examined at 1, 2 and 3 hours as triplicate. Positive control was metronidazole (50 µg/mL). The number of live and dead parasites was counted by trypan blue stain with a Neubauer slide.

Results: The viability of the macrophages for lavender essential oil was 93.70% and for nanoemulsion was 90.90%. Essential oil and nanoemulsion of lavender in concentration of 100 µg/mL and during 3 hours showed 81.7% and 81.9% growth inhibitory, respectively. This difference was not statistically significant.

Conclusion: Lavender essential oil and nanoemulsion has a desirable inhibitory effect on growth of *T. vaginalis* and can be a good choice for conducting therapeutic investigations regarding trichomonal infections.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, *Lavandula officinalis*, Essential oil, Nanoemulsion, TYM complete

* Corresponding Author.

Email: mahdif53@yahoo.com

Tel: 0098 912 252 2782

Fax: 0098 11 335 43248

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2017; Vol. 21, No 4, Pages 326-334

Please cite this article as: Ziae Hezar Jaribi H, Nadeali N, Saeedi M, Soosaraei M, Jorjani O, Momeni Z, et al. The effect of lavender essential oil and nanoemulsion on *Trichomonas vaginalis* in vitro. Feyz 2017; 21(4): 326-34.

بررسی تاثیر اسانس و نانوامولسیون اسطوخودوس بر تریکوموناس واژینالیس در شرایط برونتنی

هاجر ضیابی هزارجریبی^۱، نجمه نادعلی^۲، مجید سعیدی^۳، مسعود سوسایی^۴، اوغل نیاز جرجانی^۵، زهره مومنی^۶، مهدی فخار*

خلاصه:

سابقه و هدف: تریکوموناس واژینالیس (ت. واژینالیس) عامل تریکومونیازیس است. با توجه به افزایش مقاومت و وجود عوارض جانبی داروها، بررسی اثر ضد تریکومونایی اسانس و نانوامولسیون اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) بر تریکوموناس واژینالیس در شرایط برونتنی هدف این تحقیق است.

مواد و روش‌ها: اجزای اسانس اسطوخودوس با گاز کروماتوگرافی مشخص شد. برای تعیین اثرات سمیت سلولی، از سلول‌های ماکروفاز رده A.1 استفاده شد. ت. واژینالیس از ترشحات زنان مبتلا، جداسازی و سپس در محیط TYM Complete کشت و به مدت ۱۰ روز پاساز داده شد. تأثیر اسانس و نانوامولسیون ۱ درصد اسطوخودوس در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت به صورت سه تایی در پلیت ۲۴ خانه‌ای انجام شد. کنترل مثبت، مترونیدازول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. تعداد انگل زنده و مرده بدوسیله تربیان بلو بالام تنبار شمارش شد.

نتایج: زندمانی ماکروفازها برای اسانس و نانو به ترتیب ۹۳/۷۰ و ۹۰/۹۰ درصد بود. اسانس و نانوامولسیون اسطوخودوس در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۳ ساعت به ترتیب ۸۱/۷ و ۸۱/۹ درصد مهار رشد را نشان دادند. این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: اسطوخودوس در اشکال اسانس و نانوامولسیون دارای خاصیت مهار رشد مطلوبی است و می‌تواند انتخاب مناسبی برای انجام تحقیقات درمانی عفونت‌های تریکومونایی باشد.

وازگان کلیدی: تریکوموناس واژینالیس، اسطوخودوس، اسانس، نانوامولسیون، TYM Complete

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۳۳۴-۳۲۶

در ایران شیوع کلی عفونت تریکوموناس واژینالیس ۸ درصد و در نواحی مختلف بین ۰/۵ تا ۳۰ درصد گزارش شده است [۴، ۵، ۶]. این عفونت سبب ایجاد عوارض فراوانی در زنان و مردان مبتلا می‌شود [۶-۹]. تشخیص قطعی بیماری با انجام روش‌های آزمایشگاهی امکان‌پذیر می‌باشد [۱۰]. داروی رایج در درمان این عفونت مترونیدازول می‌باشد که عوارض مختلفی داشته و با محدودیت به ویژه در دوران بارداری مصرف می‌شود. با توجه به اینکه گزارشات متعددی از کشورهای مختلف مبنی بر مقاومت دارویی وجود دارد، محققان را برآن داشته تا به جستجوی داروهای جایگزین با عوارض جانبی کمتر پردازند [۱۱]. گیاه اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula officinalis* و از خانواده نعنایان (Labiatae) است که در نواحی مختلف مانند مدیترانه، جنوب غربی آسیا، شمال آفریقا و اروپا رویش دارد. اسانس اسطوخودوس حاوی بیش از ۴۲ ترکیب شامل استات لینالیل (۶۰-۳۰ درصد)، سینوئل (۱۰ درصد)، لینالول، نزول، برنول، فلاونوئیدها، تانن‌ها و کومارین‌ها می‌باشد [۱۲]. تاکنون بیشتر تحقیقات روی فعالیت‌های ضدبacterیایی و ضدقارچی اسانس اسطوخودوس متumerکز بوده است و ویژگی‌های ضد تک‌یاخته‌ای آن کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از سوی دیگر، نتایج مطالعات

مقدمه

تریکوموناس واژینالیس تک‌یاخته تاژک‌دار دستگاه ادراری تناسلی انسان می‌باشد که عامل تریکومونیازیس است [۱]. این انگل دارای انتشار جهانی است و در تمام گروه‌های نژادی، اجتماعی و اقتصادی وجود دارد [۲]. طبق تخمین سازمان بهداشت جهانی سالانه ۱۸۰ میلیون زن در سراسر جهان آلوده به تریکوموناس واژینالیس می‌شوند [۳].

^۱ دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۳ استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۴ دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۵ استادیار، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

^۶ استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

* نشان نویسنده مسئول، ساری، کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع پیامبر اعظم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی

تلفن: ۰۱۲۲۵۲۷۸۲، دوپلوبیوس، ۱۱۳۳۵۴۳۴۸

پست الکترونیک: mahdif53@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۶/۴/۱۳، تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۰

مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۹]. فرمولاسیون نانومولسیون اسانس از گروه داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران دریافت شد. برای تهیه نانوذرات MTI از دستگاه پرورب شرکت امواج فراصوت با ژنراتور مدل ۳۰ سوئیس، ۴۰۰ وات، ۲۲۰ ولت، فرکانس ۲۰/۵ کیلو هرتز، دامنه ۳۰ درصد و قطر پرورب ۱۹ سانتی‌متر استفاده شد و نانومولسیون حاوی ۱۰ درصد اسانس تهیه گردید. برای تهیه نانومولسیون از پلی‌وینیل کلر تویین ۸۰ و لیستین استفاده شد. در انتهای، ظروف حاوی نانومولسیون به خوبی پوشانده شده و در دمای یخچال دور از نور نگهداری شدند [۱۹].

تعیین اندازه ذرات نانومولسیون

اندازه ذرات تهیه شده به وسیله دستگاه DLS (Dynamic light scattering) تعیین گردید. اندازه ذرات اسانس و نانومولسیون گیاه اسطوخودوس و رزماری به ترتیب 10.4 ± 5.3 و 9.8 ± 4.6 نانومتر بود. همچنین، محدوده توزیع ذرات به کمک دستگاه بدست آمد.

کروماتوگرافی گازی مس اسپکتروسکوپی (GC-MS)

استفاده از دستگاه Hewlett Packard 6890 series است. مويينه آن به شرح زير تنظيم گردیده بود: ابتدا $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$, film thickness ۰.۲۵ mm (μm) انجام شد که برنامه آن به شرح زير تنظيم گردیده بود: ابتدا 5°C در دمای 60°C و سپس افزایش دما تا 220°C انجام شد (۴ دقیقه در هر دقیقه). از گاز هلیوم به عنوان حامل با سرعت 2 mL/min استفاده گردید. مقدار جدا سازی $1:40$ ، انرژی بویزه 70 eV ، زمان اسکن ۱ ثانیه و $40-400\text{ m/z}$ کننده acquistion mass range.

برآورد سمیت سلولی اسانس و نانومولسیون رزماری بر ماکروفازها بدین‌منظور از ماکروفازهای رده سلولی J774.A.1 استفاده گردید و پس از افزودن سلول‌ها به تعداد 2×10^5 در هر خانه از پلیت‌های ۹۶ خانه و اتصال سلول‌ها به پلیت، غلظت IC₅₀ از اسانس و نانومولسیون رزماری به آن‌ها افزوده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد از گاز CO₂ قرار داده شد. پس از آن با روش رنگ‌سنگی MTT و مقایسه جذب نوری با کنترل بدون دارو میزان زنده بودن سلول‌ها و سمیت دارو

نشان می‌دهد که این اسانس روغنی دارای قدرت ضد تک‌یاخته‌ای بالایی است؛ اگرچه نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه است [۱۵-۱۳]. در یک مطالعه تاثیر اسانس دوگونه از اسطوخودوس (L. anagustifula و L. intermedia) روی تریکومونای هردوگونه آن به اثبات رسیده است [۱۳]. با توجه به قطعی نبودن اثر درمانی داروهای ضد انگلی و عوارض جانبی آن‌ها، طی سال‌های اخیر به استفاده از نانوذرات در درمان بیماری‌ها از جمله بیماری‌های انگلی توجه ویژه‌ای شده است. یافته‌ها نشان می‌دهد که نانوذرات نقره، طلا، کیتوزان و اکسید فلزات روی انگل‌های مختلف از جمله ژیاردها، لیشماینا، مالاریا و توکسوبلاسمای اثر کشنده‌ی با مهار-کننده‌ی رشد دارند. از سوی دیگر، نانومولسیون‌ها که امولسیون‌های حقیقی با قطراتی با اندازه بینهایت کوچک هستند، یک سیستم با پایداری ترمودینامیکی و سینتیکی می‌باشند. خصوصیات نانومولسیون‌ها کاربرد آنها را جهت مطالعات بنیادی و کاربردی (شیمیایی، دارویی، بهداشتی و دیگر حوزه‌ها) مناسب نموده است [۱۸-۱۶]. تاکنون مطالعه‌ای روی فعالیت ضد تریکومونای اسطوخودوس در اشکال نانومولسیون صورت نگرفته است. لذا با توجه به مطالب پیش‌گفته و نیز افزایش روبه رشد مصرف گیاهان دارویی در جهان، این تحقیق با هدف ارزیابی تاثیر ضد تریکومونای اسانس و نانومولسیون گیاه اسطوخودوس در شرایط برونتی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس

اسانس گیاه اسطوخودوس از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

آماده سازی نانومولسیون

از اسانس گیاه اسطوخودوس با استفاده از بافر فسفات ۱۰ درصد با pH=۶/۴ رقت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. برای تهیه محلول نانو اسطوخودوس، امولسیون آب و روغن از اسانس اسطوخودوس با توئین ۸۰ و span60 به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. محلول حاصل با استفاده از دستگاه سونیکاتور به مدت ۴۰ دقیقه سونیکه شد و بعد از سونیکاسیون، محلول آبی-روغنی اسانس اسطوخودوس به وسیله کیسه‌های یخچی سرد شد. در نهایت مشخصات فیزیکوشیمیایی محلول حاصل با استفاده از Zeta sizer

مثبت محیط‌های کشت حاوی تریکوموناس و مترونیدازول و کترل منفی محیط کشت حاوی تریکوموناس بود) استفاده شد. در نهایت به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه به ترتیب ۲۰۰ لاندا محیط کشت TYM، ۱۰۰ لاندا محیط کشت که تعداد انگل در هر میلی‌لیتر آن ۵۰۰۰۰۰ بود، و ۲۰۰ لاندا دارو که با بافر فسفات در غلظت‌های مختلف تهیه شده بود. پلیت‌ها داخل انکوباتور قرار داده شده و در فواصل زمانی ۱، ۲ و ۳ ساعت انگل از نظر تحرک و زنده بودن با رنگ تریپان‌بلو (انگل‌های مرده رنگ را جذب کرده و انگل‌های زنده بی‌رنگ باقی می‌مانند) و شمارش تعداد انگل با لام نتوبار و میکروسکوپ (عدسی ۴۰) بررسی شد. فاکتورهای بررسی عبارت بودند از: زمان تاثیر، غلظت تاثیر، تعداد انگل در هر مرحله، زنده بودن و تحرک [۲۲].

شمارش سلولی

برای تعیین تعداد کل سلول و درصد سلول‌های زنده از لام نتوبار و تکنیک رنگ‌آمیزی با محلول تریپان‌بلو استفاده شد. این لام دارای یک مریع مرکزی است که به ۲۵ مریع تقسیم شده و ۴ مریع جانبی که هر کدام به ۱۶ مریع تقسیم شده‌اند. جهت شمارش از مریع‌های ۱۶ خانه‌ای استفاده می‌کنیم. طول و عرض هر کدام از این مریع‌ها ۰/۱ میلی‌متر است که پس از گذاردن لام روی آن ارتفاع لام و لام ۱ میلی‌لیتر شده و در مجموع حجم ۰/۰۱ میلی‌لیتر مکعب می‌شود. پس از افزودن سوسپانسیون سلولی به فضای بین لام و لام تعداد کل سلول‌ها در مریع ۱۶ خانه‌ای برابر است با تعداد سلول یا انگل در هر ۱۰ به توان منهای ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی مورد آزمایش. تعداد سلول‌ها و انگل‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون مطابق فرمول زیر به دست می‌آید: تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر = $۰,۰۰۰ \times \frac{۱}{۴}$ تعداد کل سلول‌ها در هر مریع ۱۶ خانه‌ای. سلول‌های شمارش شده به‌نحوی توسط محیط کشت TYM Complet رقیق می‌شوند که تعداد انگل در هر میلی‌لیتر آن $۵ \times ۰,۰۰۰۰۰$ سلول باشد [۲۲].

آنالیز آماری

در این تحقیق اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ آنالیز شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تعییزی و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA test) و آزمون تعییزی حداقل تفاوت معنی‌دار فیشر (LSD) استفاده شد. همچنین، معنی‌داری تغییرات مهار رشد در طی زمان در هر یک از محیط‌های کشت با استفاده از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر ارزیابی شد و جهت مقایسه زمان‌ها نیز از آزمون LSD استفاده

محاسبه گردید. درصد زنده بودن سلول‌ها با فرمول زیر محاسبه گردید [۲۲]:
$$۱۰۰ \times (\text{جذب نوری در چاهک کترل بدون دارو} / \text{جذب نوری در چاهک دارو زده}) = \text{درصد زنده بودن سلول‌ها}$$

روش نمونه‌گیری

در این مطالعه تجربی از قسمت فورنیکس خلفی واژن زنان دارای علائم واژینیت و بدون سابقه مصرف داروی مترونیدازول که به مراکز درمانی مراجعه کرده بودند، تحت نظر پزشک متخصص زنان و با استفاده از یک سوآپ استریل ترشحات جمع‌آوری شده و سوآپ نمونه در ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شد. تریکوموناس به‌روش مستقیم مشاهده شد و تروفوزوئیت زنده و متحرك آن‌ها تأیید گردید [۲۳].

کشت تریکوموناس واژینالیس

تروفوزوئیت‌های تأیید شده تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت (TYM complete) در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. این محیط کشت حاوی سرم گوساله و آنتی‌بیوتیک‌هایی از جمله سفتیراکسون، سپروفلوکساسین مایع و آمفوتیریسین B می‌باشد. روش کار بدین صورت بود: در داخل لوله‌های فالکون و در کنار شعله و شرایط کاملاً استریل زیرهود لوله حاوی محیط کشت TYM و انگل از انکوباتور ۳۷ درجه خارج شده و در کنار شعله بدون تکان دادن لوله محلول رویی تخلیه شده و رسوب انتهایی باقی ماند. سپس، ۱۰ CC محیط کشت تازه که از قبیل تهیه و در یخچال نگهداری شده بود، بعد از قرار گرفتن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه به رسوب انتهایی حاوی انگل تریکوموناس اضافه گردید و مجدداً به انکوباتور منتقل شد. این عمل هر ۴۸ ساعت یکبار انجام گرفت و با عمل پاساژ دادن تعداد انگل را افزایش داده تا زمانی که میزان آن به ۵۰۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر رسید.

تاثیر اسانس و نانومولسیون گیاه اسطوخودوس روی انگل تریکوموناس واژینالیس

تروفوزوئیت‌های تأیید شده تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت (TYM complete) در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. تعداد تک‌یاخته در هر میلی‌لیتر از محیط کشت به وسیله لام نتوبار شمارش شد. از گیاه رزماری رقت‌های سریالی ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حالت اسانس و نانو تهیه شد. سپس، از پلیت‌های ۲۴ خانه همراه با کترل مثبت و منفی (کنترل

بدیهی است که سمیت از کسر عدد به دست آمده از ۱۰۰ به دست می‌آید:

Cell viability (%)=(Optical density in sample well/Optical density in control well)×100
در نهایت برای برآورد اینکه دارو و ترکیبات تنها بر انگل مؤثر بوده و روی ماکروفازها تاثیر سمی نداشته است، پس از محاسبه مقدار IC₅₀ تریکوموناس و اژنالیس، ماکروفازهای قادر انگل در معرض غلظت IC₅₀ قرار داده شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، آزمایش رنگستنجی MTT انجام گردید و جذب نوری با کنترل بدون دارو مقایسه شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- برآورد سمیت سلولی انسان‌ها و نانومولسیون اسطوخودوس بر ماکروفازها

ترکیب	درصد سمیت	درصد زنده‌مانی
Lavandula	۹۳/۷۰	۶/۳۰
Nano-lavandula	۹۰/۹۰	۹/۰۹

نتایج مربوط به اثر انسان و نانومولسیون اسطوخودوس روی انگل تریکوموناس و اژنالیس

اثر غلظت‌های مختلف گیاه در حالت انسان و نانو طی سه زمان با شمارش تعداد انگل تریکوموناس و اژنالیس به کمک لام نثوبار و رنگ تریپان‌بلو انجام شد و درصد زنده بودن و مهار رشد انگل نیز محاسبه گردید (جدول شماره ۳ و نمودار شماره ۱). اثر رقت‌های مختلف نانومولسیون و انسان‌گیاه اسطوخودوس در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت روی انگل در مجاورت کنترل مثبت مترونیدازول $\mu\text{g}/\text{ml}$ و کنترل منفی به صورت زیر است: مهار رشد انگل در تمامی رقت‌های انسان و نانومولسیون دیده شد، اما بهترین اثر، غلظت $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ بعد از ۳ ساعت بود (جدول شماره ۳ و نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۳- بررسی درصد انگل زنده و مقایسه مهار رشد انگل در رقت‌های مختلف انسان اسطوخودوس با کنترل مثبت و منفی

P	۳ ساعت			۲ ساعت			۱ ساعت		
	IC50: (۷/۰۷)	IC50: (۱۲/۱۲)	IC50: (۳۱/۵۱)	کلاس	کلاس	کلاس	کلاس	کلاس	کلاس
۰/۰۲۶	/۰	۱۰۰±۰	aA	۳/۹	۹۴/۳±۵/۴	aAB	۱۱/۳	۸۷/۱±۱/۲	aB
۰/۳۶۸	۵۵	/۰±۰	fA	۶۸/۳	/۰±۰	fA	۸۷/۸	/۰±۰/۵	fA
P<0/0001	۴۰	۲۷/۲±۱/۷	eA	۵۹/۶	۱۲/۴±۰/۵	eB	۶۹/۶	۲۰/۷±۱/۲	eC
۰/۰۱۱	۲۶/۳	۵۲±۴/۶	dA	۴۲/۸	۳۷/۳±۶/۱	dAB	۵۹/۳	۳۲/۴±۲/۲	dB
۰/۰۴۱	۲۰/۴	۶۲/۷±۷/۳	cA	۳۳/۲	۵۱/۳±۵/۸	cAB	۴۵/۶	۴۸/۱±۱/۶	cB
P<0/0001	۱۰	۸۱/۷±۴/۷	bA	۲۶/۴	۶۱/۲±۲/۶	bB	۳۶/۳	۵۸/۷±۱/۴	bB
P<0/0001			P<0/0001			P<0/0001			P

حروف انگلیسی کوچک مشابه در هر ستون بیان گر عدم اختلاف بین محیط‌های کشت و حروف انگلیسی بزرگ مشابه هر ستون بیان گر عدم اختلاف بین زمان‌ها در هر محیط کشت می‌باشد.

نتایج

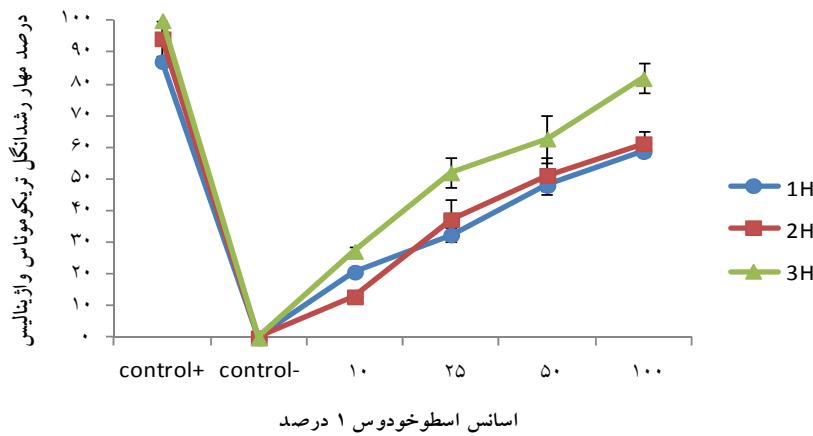
گرددید. $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج مربوط به GC-Mass و سمیت سلولی GC-MASS در این پژوهش از ۱۰۱ ترکیب موجود در انسان گرفته شده از سرشاخه‌های گل-دار اسطوخودوس ۸ ترکیب عمده با مقدار بیشتر از ۴ درصد بودند که همگی جزء مونوترپین‌ها می‌باشند (جدول شماره ۱). این ۸ ماده به ترتیب فراوانی عبارت بودند از: ۱ و ۸ سینتول (۲۲/۲۹ درصد)، لینالول (۱۱/۲۲ درصد)، بتا-پین (۵/۷۸ درصد)، آلفا-تریپینول (۴/۸۵ درصد)، آلفاپین (۴/۵۶ درصد)، ترپین-۴-آل (۴/۱۹ درصد)، و بورنیول (۴/۰۳ درصد).

جدول شماره ۱- اجزای عمده تشکیل‌دهنده انسان اسطوخودوس با استفاده از تکنیک گاز کروماتوگرافی

آنسان	AL	تشکیل‌دهنده	شماره	سطح زیر	زمان بازداری (min)	منحنی (درصد)	پیک
۹۳۲		Alfa-pinene	۶	۷/۷۴	۴/۵۶		
۹۷۴		Bta- pinene	۸	۹/۰۴	۵/۷۸		
۱۰۴۶		1, 8- Cineole	۱۲	۱۰/۸۱	۲۲/۲۹		
۱۰۹۵		Linalool	۲۱	۱۳/۲۱	۱۱/۲۲		
۱۱۴۱		Camphor	۲۴	۱۴/۶۵	۷/۸۸		
۱۱۶۵		Borneol	۲۶	۱۵/۴۱	۴/۰۳		
۱۱۷۴		Terpinen-4-ol	۲۷	۱۴/۰۴	۴/۱۹		
۱۱۸۶		Alfa-terpineol	۲۹	۱۶/۶۲	۴/۸۵		

به منظور بررسی سمیت سلولی، سلول‌های ماکروفازهای رده سلولی J774.A.1 در برابر رقت‌های سریالی از انسان‌ها و نانومولسیون گیاه اسطوخودوس قرار داده شده و پس از انجام تست MTT درصد زنده بودن ماکروفازها با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:



نمودار شماره ۱- درصد مهار رشد انگل تریکوموناس و اژینایس در مجاورت اسانس اسطوخودوس طی زمان

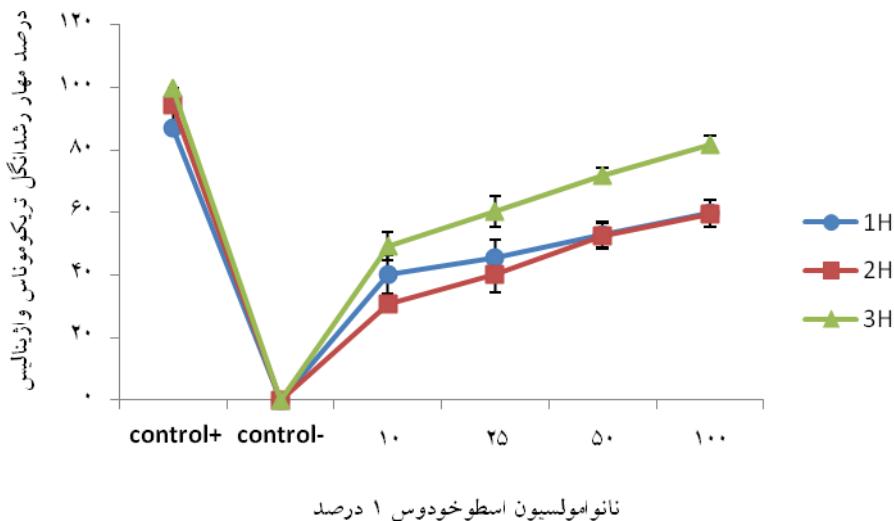
زمان مهار رشد اتفاق افتاده و همچنین با افزایش رقت اسانس اسطوخودوس مهار رشد رو به افزایش بوده است. در نهایت رقت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اسانس اسطوخودوس در مقایسه با کنترل مثبت بهترین عملکرد را در طی زمان بر مهار رشد انگل داشته است (جدول شماره ۳، نمودار شماره ۱).

بررسی یافته‌ها نشان می‌دهد در گروه کنترل منفی در طی زمان کمترین مهار رشد و بیشترین تعداد انگل زنده مشاهده شده و در گروه کنترل مثبت بهترین مهار رشد صورت گرفته است و در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت تمامی رقت‌های اسانس اسطوخودوس با گروه کنترل مثبت و منفی باهم اختلاف معنی‌دار داشتند. در طی

جدول شماره ۴- بررسی درصد انگل زنده و مقایسه مهار رشد انگل در رقت‌های مختلف نانومولسیون اسانس اسطوخودوس با کنترل مثبت و منفی

P	۳ ساعت			۲ ساعت			۱ ساعت			کنترل مثبت	
	IC50: (۰/۹۶)			IC50: (۵/۱۳)			IC50: (۱۵/۶۱)				
	L%	GI±Std	کلاس	L%	GI±Std	کلاس	L%	GI±Std	کلاس		
۰/۰۲۶	/۰	۱۰۰±۰	aA	۳/۹	۹۴/۳±۵/۴	aAB	۱۱/۳	۸۷/۱±۱/۲	aB	کنترل مثبت	
۰/۳۶۸	۵۵	/۰±۰	fA	۶۸/۳	/۰±۰	fA	۸۷/۸	/۰±۰	eA	کنترل منفی	
۰/۰۰۲	۲۷/۹	۴۹/۴±۴/۵	eA	۴۷/۲	۳۰/۹±۱/۴	eB	۵۲/۵	۴۰/۱±۶/۱	dB	۱۰	
۰/۰۳۸	۲۱/۹	۶۰/۳±۵/۱	dA	۴۰/۸	۴۰/۲±۵/۷	dAB	۴۷/۶	۴۵/۷±۵/۴	c dB	۲۵	
۰/۰۱۰	۱۵/۵	۷۱/۹±۲/۵	cA	۳۲/۳	۵۲/۷±۴/۱	cB	۴۱/۲	۵۳±۴/۲	b cB	۵۰	
P<0.0001	۱۰	۸۱/۹±۲/۸	bA	۲۷/۷	۵۹/۴±۰/۸	bB	۳۵/۲	۵۹/۸±۴/۴	bB	۱۰۰	
P<0.0001			P<0.0001			P<0.0001			P		

حروف انگلیسی کوچک مشابه در هر ستون بیان گر عدم اختلاف بین غلطت‌ها و حروف انگلیسی بزرگ مشابه در هر سطر بیان گر عدم اختلاف بین زمان‌ها می‌باشد.



نمودار شماره ۲- درصد مهار رشد انگل تریکوموناس و اژنالیس در مجاورت نانومولسیون اسطوخودوس طی زمان

نیفتداده، ولی نزدیکترین عملکرد را در طی زمان در مقایسه با سایر رقت‌ها بر مهار رشد انگل نسبت به گروه کنترل مثبت داشته است. موثرترین غلظت‌های اسانس و نانومولسیون اسطوخودوس که ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، باهم مقایسه شدند و نتایج نشان دادند که نانومولسیون مشابه با اسانس عمل کرده و اختلاف آماری معنی داری بین آن‌ها وجود ندارد (جدول شماره ۴ و نمودار شماره ۲).

هم‌چنین، بررسی یافته‌ها نشان می‌دهد در محیط کنترل منفی در طی زمان کمترین مهار رشد انگل مشاهده شده و در کنترل مثبت بهترین مهار رشد صورت گرفته است و در طی زمان تمامی رقت‌های نانومولسیون اسطوخودوس با گروه کنترل مثبت و منفی دارای اختلاف معنی دار بودند. در طی زمان با افزایش رقت مهار رشد رو به بالا بوده و در رقت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانومولسیون اسطوخودوس علی‌رغم اینکه مهار کامل در آن اتفاق

جدول شماره ۵- بررسی درصد انگل زنده و مقایسه مهار رشد انگل در رقت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس و نانومولسیون اسطوخودوس با کنترل مثبت و منفی

P	۳ ساعت			۲ ساعت			۱ ساعت			P
	L%	GI±Std	کلاس	L%	GI±Std	کلاس	L%	GI±Std	کلاس	
.0/۰۶	۱۰	۱۰۰±۰	aA	۳/۹	۹۴/۳±۵/۴	aAB	۱۱/۳	۸۷/۱±۱/۲	aB	کنترل مثبت
.۰/۳۶۸	۵۵	/۰±۰	dA	۶۸/۳	/۰±۰	cA	۸۷/۸	/۰±۰	cA	کنترل منفی
P<۰/۰۰۰۱	۱۰	۸۱/۷±۴/۷	cA	۲۶/۴	۶۱/۳±۳/۶	bB	۳۶/۳	۵۸/۷±۱/۴	bB	اسانس
P<۰/۰۰۰۱	۱۰	۸۱/۹±۲/۸	cA	۲۷/۷	۵۹/۴±۰/۸	bB	۳۵/۲	۵۹/۸±۴/۴	bB	نانومولسیون
		P<۰/۰۰۰۱			P<۰/۰۰۰۱			P<۰/۰۰۰۱		P

حروف انگلیسی کوچک مشابه در هر ستون بیان‌گر عدم اختلاف بین غلظت‌ها و حروف انگلیسی بزرگ مشابه در هر سطر بیان‌گر عدم اختلاف بین زمان‌ها می‌باشد.

بحث

در این مطالعه قدرت مهار رشد انگل طی زمان و در مجاورت کلیه غلظت‌های سریالی اسانس و نانومولسیون گیاه اسطوخودوس بررسی شده و مشاهده گردید که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس و نانومولسیون اسطوخودوس در طول ۳ ساعت به ترتیب ۸۱/۷ و ۸۱/۹ درصد مهار رشد نشان می‌دهند، در صورتی که مترونیدازول طی ۲، ۱ و ۳ ساعت به ترتیب ۸۷ و ۹۴ و ۱۰۰ درصد مهار رشد را نشان داد. اثر مهاری نانومولسیون

با توجه به نتایج جدول شماره ۵، در گروه کنترل منفی در طی زمان کمترین مهار رشد انگل مشاهده شده و در گروه کنترل مثبت بهترین مهار رشد صورت گرفته است. طی زمان موثرترین رقت‌های اسانس و نانومولسیون اسطوخودوس با گروه کنترل منفی اختلاف معنی دار داشتند. به علاوه هفت در طی زمان با افزایش رقت، مهار رشد انگل قابل توجه بوده است. موثرترین غلظت اسانس و نانومولسیون اسطوخودوس ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در طی زمان تاثیری مشابه هم در مهار رشد انگل داشته‌اند.

۰/۱ درصد اسانس اسطوخودوس در مدت ۵۵ دقیقه تمامی انگل‌ها را از بین می‌برد [۲۵]. Bouzouita و همکاران روغن گرفته شده از برگ‌های خشک شده اسطوخودوس را توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز نمودند. فنکون و کمفور ترکیبات اصلی در میان ۲۸ مولکول شناخته شده بودند. آن‌ها نشان دادند این روغن بر علیه باکتری‌های مختلف و دو گونه آسپریلیوس تاثیر قابل قبولی داشته و حساس‌ترین باکتری در مقابل روغن گرفته شده از برگ این گیاه، استانیلوکوکوس اورئوس است [۲۶]. یکی دیگر از ویژگی‌های تحقیق حاضر بررسی تاثیر فرم نانوامولسیون این گیاه برای اولین بار روی تریکوموناس واژنیالیس است که تاثیری مشابه با اسانس آن داشت. ترکیبات دارویی نانویی می‌توانند به تهابی نقش داشته باشند و یا اینکه در انتقال دارو به داخل سلول نقش داشته باشند. این مواد می‌توانند سلولی خاص و یا اندام داخل سلولی را مورد هدف قرار دهند و از این قابلیت در علوم دارویی و درمان استفاده‌های زیادی می‌شود. با توجه به این نقش ترکیبات نانو، دارویی مورد نظر می‌تواند به هدف خود در داخل یا سطح سلول بچسبید و عملکرد مناسبی داشته باشد و مانع از اتصال غیر اختصاصی دارو و هم‌چنین موجب کاهش عوارض جانبی شود. از آنجایی که اسانس اسطوخودوس براساس مطالعات آنتی‌موتاژنیک می‌باشد، و نیز بدین دلیل که تریکوموناس در دیواره سرویکس و واژن التهاب ایجاد می‌کند، شاید بوان از این گیاه نه تنها در نابودی تریکوموناس بهره گرفت که از اثرات مخرب انگل در دیواره نسوج نیز جلوگیری کرد که مطلب این نیاز به مطالعات تكمیلی دارد.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت اسطوخودوس در اشکال اسانس و نانوامولسیون به عنوان مهار کننده رشد تریکوموناس واژنیالیس مطلوب است و می‌تواند انتخاب مناسبی برای انجام تحقیقات درمانی تریکوموناس باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۱۵۴۳ مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران است. بدین‌وسیله از آن معاونت به‌خاطر حمایت‌های مالی و معنوی قدردانی می‌شود.

اسطوخودوس در تمامی غلظت‌ها و ساعت‌های تأثیری مشابه با اسانس این گیاه داشت. در این مطالعه اثر زمان اهمیت داشت و با افزایش زمان مجاورت میزان کشنندگی مشابه با کنترل مشت بود. مطالعه‌ای که توسط عزت‌پور و همکاران روی اسانس گیاه اسطوخودوس در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ درصد در مقایسه با داروی مترونیدازول انجام شد، نشان داد که در غلظت ۰/۱ درصد اسانس اسطوخودوس در مدت ۹۰ دقیقه تمامی انگل‌ها از بین رفته و برای غلظت ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ درصد حذف تمامی انگل‌ها به ترتیب ۱۲۰ و ۶ ساعت به طول انجامید [۲۳]. از علل تفاوت این مطالعه با طرح ما، کاربرد دو محیط کشت مختلف می‌باشد. در طرح ما از محیط کشت TYM complete استفاده شد که این محیط با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله آمفوتی‌سین B، سفتریاکسون، سپروفلوکساسین مایع، پنسیلین و استرپتومایسین اگزینیک شده و شانس بقای انگل در این محیط کشت افزایش می‌یابد، در صورتی که در مطالعه مذکور از محیط کشت CPLM که حاوی یک آنتی‌بیوتیک است استفاده شده و بقای این خود سبب گزینیک شدن و تغییر pH محیط کشت شده و بقای انگل را کاهش می‌دهد. هم‌چنین، اسطوخودوس دارای گونه‌های مختلفی است که هر کدام از لحاظ ژنومی، ترکیبات و خواص متفاوت هستند. بنابراین، میزان اثر آن‌ها روی تریکوموناس واژنیالیس متفاوت خواهد بود. از طرفی استفاده از قسمت‌های مختلف گیاه مثل برگ، ساقه و گل تاثیرات خاص خود را در مهار رشد انگل و اجرام دارد که احتمالاً یکی از علت‌های تفاوت نتایج این تحقیق با دیگر مطالعات می‌باشد. در مطالعه Crouch و Alderete تاثیر اسانس اسطوخودوس روی تریکوموناس واژنیالیس بررسی شده و اثر گیاه روی انگل بعد از هر ۱۵ دقیقه تا ۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفته و بعد از آن در زمان‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی می‌شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ درصد اسانس اسطوخودوس تاثیر قابل ملاحظه‌ای روی انگل تریکوموناس واژنیالیس داشته است [۲۴]. نتایج حاصل از این مطالعه در مقایسه با مطالعه عزت‌پور و همکاران تاثیر مشابه بوده است. در یک مطالعه مشابه Moon و همکاران تاثیر سه غلظت ۰/۱، ۰/۰۵ و ۱ درصد اسانس دو گونه اسطوخودوس (*lavandula intermedia* و *lavandula angustifolia*) روی تریکوموناس واژنیالیس بررسی کردند و دریافتند که غلظت

References:

- [1] Kissinger P. Trichomonas vaginalis: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis* 2015; 15(1): 307.
- [2] Bolbol-Haghig N, Ebrahimi H, Norouzi P, Delvarianzadeh M. Evaluation and comparison of clinical and paraclinical diagnosis of Trichomonas vaginitis in women referred to Shahroud City Health Care Centers. *J Shahrod Uni Med Sci Health Ser* 2008; 3(1):33-38. [in Persian]
- [3] World Health Organization. 1995. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates. WHO, Geneva, Switzerland.
- [4] Jamali R, Zareikar B , Usofi S, Ghazghanchi A. Comparison of the sensitivity of wet smear and culture for diagnosis of Trichomonas vaginalis. *J Lorestan Univ Med Sci* 2006; 8: 80-5. [in Persian]
- [5] 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.
- [6] Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(4): 794-803.
- [7] Xiao JC, Xie LF, Fang SL, et al. Symbiosis of Mycoplasma hominis in Trichomonas vaginalis may link metronidazole resistance in vitro. *Parasitol Res* 2006; 100(1): 123-30.
- [8] Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. Trichomonas vaginalis, HIV, and African-Americans. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(6): 927-32.
- [9] Ali V, Nozaki T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 164-87.
- [10] Wright JM, Dunn LA, Kazimierczuk Z, Burgess AG, Krauer KG, Upcroft P, et al. Susceptibility in vitro of clinically metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis to nitazoxanide, toycamycin, and 2- fluoro-2'-deoxyadenosine. *Parasitol Res* 2010; 107(4): 847-53.
- [11] Aazami M, Valizadeh M, Ezatpur B. Effectiveness of Dex Properanolol Hydrochloride on Trichomonas vaginalis growth under In-vitro condition. *Submedical J Shahid Beheshti Uni Med Sci* 2004; 6: 319. [in Persian]
- [12] Upson T, Andrews S. The genus Lavandula. Royal Botanic Gardens, Kew. 2004.
- [13] Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis and Hexamita inflata. *Parasitol Res* 2006; 99(6): 722-8.
- [14] Maria do Socorro SR, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, de Almeida Rodrigues I, Soares RM, Souto-Padrón T, Alviano CS, Lopes AH. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(6): 1895-901.
- [15] Machado M, Santoro G, Sousa M, Salgueiro L, Cavaleiro C. Activity of essential oils on the growth of Leishmania infantum promastigotes. *Flavour Fragr J* 2010; 25(3): 156-60.
- [16] Mir Majidi AS, Abbasi S. Optimization of ultrasonic emulsification conditions for the production of orange peel essential oil nanoemulsions. *Monthly Nanotechnol* 2015; 52(5): 2679-89.
- [17] Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci* 2014; 9(6): 385-406.
- [18] Elmi T, Gholami S, Fakhar M, Azizi F. A Review on the Use of Nanoparticles in the Treatment of Parasitic Infections. *J Mazand Univ Med Sci* 2013; 23(102): 127-34. [in Persian]
- [19] Hashtjin AM, Abbasi S. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocoll* 2015; 44: 40-8.
- [20] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *J Am Soc Mass Spectrom* 1997; 6(8): 671-2.
- [21] Davies NW. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. *J Chromato* 1990; 503(42): 1-24.
- [22] Mahmoodi M, Nosratabadi J, Fekri A, Haghparast A, Sharifi I. Evaluation of meglumine antimonate therapy in cutaneous leishmaniasis: Comparison of in vitro sensitivity of Leishmania tropica isolates from patients treated with drug with clinical response. *Koomesh* 2003; 4(3): 39-46.
- [23] Ezatpur B, Badparva E, Ahmadi Sh, Rashidipur M, Ziaiye H. Investigation of Anti Trichomonas Vaginalis Activity of Lavandula angustifolia Essential Oil in Invitro Media. *Sci J Ilam Med Univ* 2009; 16(4): 31-7. [in Persian]
- [24] Crouch ML, Alderete JF. Trichomonas vaginalis interactions with fibronectin and laminin. *Microbiol* 1999; 145(Pt 10): 2835-43.
- [25] Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis and Hexamita inflata. *Parasitol Res* 2006; 99(6): 722-8.
- [26] Bouzouita N, Kachouri F, Hamdi M, Chaabouni MM, Aissa RB, Zgoulli S, et al. Volatile constituents and antimicrobial activity of Lavandula stoechas L. oil from Tunisia. *J Essential Oil Res* 2005; 17(5): 584-6.