The effect of acetone extract of Moringa peregrina on Trichomonas vaginalis, Candida albicans and macrophage cells in vitro.

Ebrahimi M., B [1], Sadraei J., PhD[2], Roudbarmohammadi Sh., PhD[3], Nikoomanesh F., PhD Student[4]

1. MSc Student, Department of Parasitology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Associated Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-21-82883841, Sadraeij@modares.ac.ir
3. Associated Professor, Department of Mycology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. PhD Student, Department of Mycology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University ,Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Vulvovaginal candidiasis and trichomoniasis account for at least 50 percent of all cases of vaginal infections. The main drugs used to treat these infections have numerous side effects and drug resistance to them is on the rise. The aim of this study was to investigate the anti-trichomonas and anti candidal effects of acetone extracts of Moringa peregrina in vitro.

Material and Methods: We used acetone extracts of Moringa peregrina at concentrations of 375, 750, …, 3000 and 4000 µg/ml for the treatment of trichomoniasis; and concentrations of 0/003,…, 1 and 2mg/ml for the treatment of candidiasis. We evaluated the effect of the extracts after 24 and 48 hours.

The final number of viable parasites were determined by trypan blue staining and neobar lamella; and IC50 (50% Inhibitory Concentration) value was calculated. We also calculated MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the extract for candida. The cytotoxic effect of the extract on the mice macrophage cells was investigated.

Result: Comparison between treatment and control groups revealed a significant decrease in the viability of parasites in the treatment group at all concentrations after both 24 and 48 hours ($P < 0.05$). After 24 hours the IC50 and SI values were calculated as 682 and 4.1 for parasite respectively and MIC value was 2 mg/ml for Candida albicans.

Conclusion: Considering favorable effects of acetone extract of Moringa peregrina on inhibiting the growth of Trichomonas vaginalis and Candida albicans identification and isolation of active ingredients of the plant, may lead to use of this extract for the treatment of both infections in the future studies.

Keywords: Trichomonas vaginalis, Candida albicans, Acetone extract of Moringa peregrina, Cytotoxicity, IC50, MIC.

Received: Jun 19, 2017 **Accepted:** Jan 8, 2018

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان /دوره بیست و سوم/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷ ۵۶-۴۵

تاثیر عصاره استونی گزروغن بر تریکوموناس واژینالیس ، کاندیداآلبیکنس و سلولهای ماکروفاژی در شرایط برون تنی

مینا ابراهیمی[۱]، جاویدصدرایی[۲]، شهلا رودبار محمدی[۳]، فاطمه نیکومنش[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه انگل شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران .

۲. دانشیار، گروه انگل شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:. ۸۲۸۸۳۸۴۱- ۰۲۱
Sadraeij@modares.ac.ir

۳. دانشیار، گروه قارچ شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران .

۴. دانشجوی دکترای گروه قارچ شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران .

چکیده

زمینه و هدف: ولوواژینیت کاندیدایی و تریکومونیازیس حداقل ۵۰ درصد ازکل موارد عفونتهای واژینیت را شامل می شود. داروهای اصلی جهت درمان این عفونتها دارای عوارض جانبی متعدد بوده ومقاومت دارویی نسبت به آنها در حال افزایش است. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد تریکومونایی و ضدکاندیدایی عصاره استونی گزروغن در شرایط برون تنی بوده است.

روش بررسی: تیمار انگل در غلظت‌های ۳۷۵، ۷۵۰، ... ، ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و تیمار قارچ در غلظتهای ۰/۰۰۳ ،...،۱و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر انجام و تاثیر آن در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. تعداد نهایی انگل با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی تریپان بلو و لام نئوبار مشخص و مقدار IC50 (50% Inhibiting Concentration) محاسبه شد و در مورد قارچ، مقدار MIC (Minimum Inhibitory Concentration) محاسبه گردید. یررسی سمیت سلولی عصاره روی سلولهای ماکروفاژی موش سوری انجام گرفت.

یافته ها: کاهش درصد حیات انگلها در تمامی غلظت‌ها و در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل معنی دار ($P < ۰/۰۵$) بوده است. بعد از ۲۴ ساعت مقدار IC50 وSI به ترتیب برابر ۶۸۲ و ۴/۱ میکروگرم بر میلی لیتر و مقدار MIC برابر ۲میلی گرم بر میلی لیترمحاسبه گردید.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات عصاره استونی گزروغن بر بازدارندگی رشد تریکوموناس واژینالیس و کاندیدا آلبیکنس ، این احتمال است که با شناسایی و جداسازی ماده موثره این گیاه و انجام تحقیقات بیشتر، بتوان از آن برای درمان هر دوعفونت استفاده نمود.

کلید واژه ها: تریکوموناس واژینالیس، کاندیدا آلبیکنس، عصاره استونی گزروغن، سمیت سلولی، IC50، MIC

وصول مقاله:۹۶/۳/۲۹ اصلاحیه نهایی:۹۶/۹/۱ پذیرش:۹۶/۱۰/۱۸

مقدمه

واژینیتها از شایعترین بیماریهای زنان درایالات متحده محسوب می‌شوند (۱)،که علت ۹۰ درصد آنها، سه عامل کاندیدا آلبیکانس، باکتریال واژینوزیس و تریکوموناس واژینالیس میباشند (۲). مهمترین عوامل خطرساز شناسایی شده برای بروز کاندیدیازیس، حاملگی، دیابت، داروهای سرکوب کنندهٔ ایمنی و آنتی‌بیوتیکهای وسیع‌الطیف می باشد (۳). علاوه بر آن قرصهای ضدبارداری خوراکی، وجود یا سابقه بیماریهای آمیزشی، بارداری و زایمان، فشارهای روحی و بعضی بیماریهای عمومی در بدن نیز مستعد کننده ابتلا به بیماریهای قارچی شمرده شده اند (۴ و۳)، گونه های کاندیدا از موارد مهم عفونتهای مهاجم بوده و مقاومت آنها به داروهای ضد قارچ استاندارد در حال افزایش می باشد (۵).

تریکومونیازیس شایع ترین بیماری مقاربتی غیرویروسی در جهان است که معمولا در کشورهای در حال توسعه شایع تر است(۶). این انگل همچنین مثانه، مجاری خروجی ادرار و غدد پاراورترال۱ رابه عنوان عفونت مجرای ادراری تحت تاثیر قرارمی دهد. حدود ۵۰ درصد از زنان مبتلا به عفونت تریکوموناس واژینالیس بدون علامت هستند. موارد علامت دار تریکومونیازیس به طور کلی با خارش، مقاربت دردناک، واژینیت وترشحات واژن مرتبط است (۶). علاوه بر این، زنان باردار مبتلا به تریکومونیازیس ممکن است دچارعوارض جانبی متعدد دیگری شوند که شامل زایمان زودرس، وزن کم نوزاد هنگام تولد، پارگی زودرس غشاء، نازایی لوله ایی، بیماری التهابی لگن آتیپیک میباشد. افزایش ریسک انتقال ایدز و ویروس پاپیلومای انسانی و افزایش خطر ابتلا به سرطان گردن رحم از عوارض جدی دیگر این بیماری می باشند (۹-۷).

مردان مبتلا به تریکوموناس واژینالیس معمولا بدون علامت اند و عفونت علامتدار با اورتریت (سوزش ادرار و ترشحات) مرتبط است(۶). تریکومونیازیس در مردان معمولا بدون درمان برطرف می شود(۱۰).

مترونیدازول و تینیدازول داروهای اصلی جهت درمان تریکومونیازیس می‌باشند اما مصرف این داروها دارای اثرات بالقوه سرطانزا و جهش‌زا بوده و اثرات سو بر جنین داشته و نیز مقاومت دارویی نسبت به این داروها در حال افزایش است (۱۱).در درمان بیماریهای قارچی نیز محدودیت هایی از قبیل شیوع گونه های مقاوم به عوامل ضد قارچی و اثرات جانبی آنها وجود دارد. بنابراین مطالعه بر روی داروهای جدید، که عوارض جانبی کمتری بر بیمار داشته باشد و در عین حال عامل بیماری زا را از بین برده و یا آن را مهار کند دارای اهمیت ویژه می‌باشد. بدین منظور مطالعه بر روی گیاهان دارویی حایز اهمیت می‌باشد.

جنس مورینگا از خانواده مورینگاسه و دارای ۳۳ گونه میباشد است اما فقط ۴ گونه از آن مورد بررسی قرار گرفته است.از ۲۵۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ گونه ای شماخته شده؛ مورینگا یکی از ۱۰درصدی است که به عنوان یک منبع تشکیل دهنده بیو اکتیو، پتانسیل بسیار خوبی در توسعه صنعت داروسازی دارد(۱۴-۱۲).

مورینگا پرگرینا۲ درختی است که درمناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان و در ایران در استان سیستان و بلوچستان رشد میکند و نام محلی و بومی آن، گزروغن یا گازرخ میباشد(۱۷-۱۵). ترکیبات فلاونوییدی و گلوکوزینولات و محصولات حاصل از تجزیه آن از قبیل ایزوتیوسیانات از متابولیت های مشخصه‌ی گونه مورینگا هستند (۲۰-۱۸).تعدادی از گونه های مورینگا دارای پتانسیل‌های زیادی میباشند از جمله : محرک ضربان قلب و

[1] paraurethral

[2] Moringa peregrina

گردش خون، ضد زخم معده، پایین آورنده کلسترول خون، آنتی اکسیدان، محافظت کننده‌ی کبدی، فعالیت های ضد باکتری و ضد قارچ. همچنین به صورت بومی، در درمان بیماریهای مختلف استفاده می‌شود (۲۲ و ۲۱).مطالعات نشان داده است که گزروغن در درمان بیماریهایی مثل سردرد، درد احشا، درد کمر و ماهیچه ها و سوختگی ها و نیز در درمان مالاریا، فشار خون و درد زایمان به کار می رود (۲۴ و ۲۳). علاوه بر این فعالیت های ضد قند خون در مدل های حیوانی، نشان داده شده است (۲۵). دانه‌ها و روغن آنها دارای خواص دارویی از جمله، آنتی میکروبیال، آنتی تومور و ضد التهاب و ادرارآور می‌باشد و فعالیتهای ضدلاروی علیه پشه هایی که تب دانگ و تب زرد را انتقال می دهند را داراست (۲۷و۲۶و۲۴و۲۳). در طب سنتی گزروغن به عنوان ضد اسپاسم، ضد درد و ضد التهاب استفاده می شده است(۲۶) .به دنبال پیدا کردن یک داروی جایگزین برای درمان تریکومونیازیس و کاندیدیازیس، در این مطالعه اثرعصاره استونی گیاه گزروغن علیه این عفونتها در محیط کشت بررسی شد.

روش بررسی

تهیه عصاره :

در یک مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، ابتدا سرشاخه‌ها به همراه برگ و دانه‌های گیاه گزروغن از شهرستان بشاگرد جمع آوری وباکد هرباریومی ۳۵۹۰ به تایید مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان با رسید؛ سپس گیاه در سایه خشک و پودر گردید وعصاره استونی به روش خیساندن تهیه و سپس رقت‌های مختلف(۳۷۵، ۷۵۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰) از عصاره تهیه گردید.

تهیه مترونیدازول:

از مترونیدازول مایع تزریقی تجارتی (۵ میلی‌گرم در میلی لیتر) به وسیله PBS (PH=6.5)، رقت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد.

تهیه انگل:

نمونه تریکوموناس واژینالیس از رسوب ادرار زنان با علایم واژینیت گرفته شده و در محیط کشت TYM (Trypticase Yeast Extract) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده ودر فاز لگاریتمی جمع آوری شدند سپس توسط شمارش با لام نئوبار تعداد ۱۰۴ × ۵ انگل در میلی لیتر در محیط نهایی آزمایش بدست آمد.

مجاورت انگل با عصاره و مترونیدازول:

ابتدا به هر چاهک از پلیت ۴۸ خانه مقدار ۲۰۰ میکرولیتراز عصاره استونی گزروغن در غلظت‌های ۳۷۵، ۷۵۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی تروفوزوئیت تریکوموناس واژینالیس (تعداد نهایی انگل ۵۰۰۰۰ در هر میلی لیتر از محیط کشت) اضافه شد. جهت اطمینان از انجام صحیح آزمایش برای هر رقت ۳ چاهک ، در نظر گرفته شده و هرآزمایش بصورت ۳ بار تکرار انجام گرفت. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد انگل زنده در هر چاهک با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی (تریپان بلو) شمارش گردید.

در هر آزمایش، سه چاهک به کنترل منفی (حاوی تروفوزوئیت و محیط کشت) و سه چاهک به عنوان کنترل مثبت (حاوی تروفوزوئیت و داروی مترونیدازول) اختصاص یافت. و درصد حیات انگلها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید جدول(۱).

درصد حیات = (GRextract/GRcontrol) 100

GR= Growth Rate

میزان سمیت عصاره بر سلول ماکروفاژی نیز با استفاده از آزمون MTT انجام گرفت. و با استفاده از فرمول زیر درصد حیات سلولها درغلظتهای مختلف دارو بدست آمد جدول(۲).

درصد حیات = [AT-AB]/[AC-AB]×100

AB جذب نوری چاهک بلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با دارو است.

تهیه سوسپانسیون از کاندیدا آلبیکنس استاندارد ATCC10231

سویه قارچی روی محیط سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفیکل کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور۳۲ درجه قرار گرفتند سپس از هر کدام از این سویه های قارچی یک کلنی به سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرده و با شمارش سلولی توسط لام نئوبار سوسپانسیون قارچی ۱۰۳cell/ml تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC۱) با استفاده از از روش میکرودایلوشن :

برای تعیین MIC ابتدا به هریک از چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای ۱۰۰میکرولیتر از محیط yeast nitrogen base (YNB) اضافه نموده، سپس رقتهای سریالی از عصاره استونی گزروغن در چاهکها، افزوده بدین ترتیب که ،۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به چاهک اول از سمت چپ به راست اضافه و به خوبی با محیط مخلوط گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر برداشته از چاهک اول به چاهک دوم اضافه شده . به همین ترتیب سریال دایلوشن شامل رقتهایی۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱، ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۳ میلی گرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شده است در هر چاهک تهیه و در نهایت از چاهک دهم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و دور ریخته شد. در این روش چاهک اول حاوی بیشترین غلظت و چاهک دهم حاوی کمترین غلظت است. به تمام چاهک ها ۱۰میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری استاندارد اضافه شد. حجم نهایی برابر ۱۰۰ میکرولیترمیباشد.

چاهک ۱۱ حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی و چاهک ۱۲ حاوی محیط کشت وغلظت ۰/۰۵ mg/ml ایتراکونازول (کمترین غلظت مهار رشد) و سوسپانسیون به عنوان کنترل مثبت است. سپس میکروپلیت در دمای ۳۲ درجه به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردید (این مرحله به صورت تریپلیکت انجام شد).

پس از این مدت از تمام چاهک ها ۱۰ میکرولیتر برداشته شد و روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفیکل کشت و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۲ درجه جهت تعیین میزان عدم رشد مخمر انکوبه شد. سپس کلنی ها تک شمارش شده و جهت محاسبه درصد رشد از قرمول زیر استفاده شد (۲۸):

$$\text{Colony count} = 1 - N1/N2 \times 100$$

N1: کلنی مجاور شده با عصاره

N2: کلنی کنترل مجاور نشده با عصاره

آنالیزها با استفاده از نرم افزار spss ورژن ۲۱ و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) انجام گرفت. مقدار IC50 و CC50 با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 5 محاسبه گردید.

یافته ها

درصد انگل‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت در بالاترین غلظت عصاره یعنی ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۱۹/۳۵ ٪ و بعد از ۴۸ ساعت به ۲/۷۷ ٪ (کمتر از پنج درصد) رسید (جدول و نمودار ۱). داروی مترونیدازول بعد از ۴۸ ساعت در غلظت ۱۰میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کشندگی ۱۰۰٪ تریکوموناس واژینالیس گردید .

مقدار IC50 برای عصاره استونی گزروغن بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۶۸۲ و ۷۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.محاسبه درصد حیات سلول ماکروفاژ بعد از تیمار با عصاره استونی گزروغن و تعیین مقدار CC50:

[1] Minimum Inhibitory Concentration

بعد از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های ماکروفاژ موش سوری با عصاره، درصد حیات سلولها در بیشترین غلظت عصاره (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ۴۱/۰۴ درصد و در کمترین غلظت یعنی ۳۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر، ۸۳/۶۷ درصد محاسبه گردید(جدول ۲). مقدار CC50 برابر با µg/ml ۲۷۹۹ بوده است.

محاسبه مقدار SI:

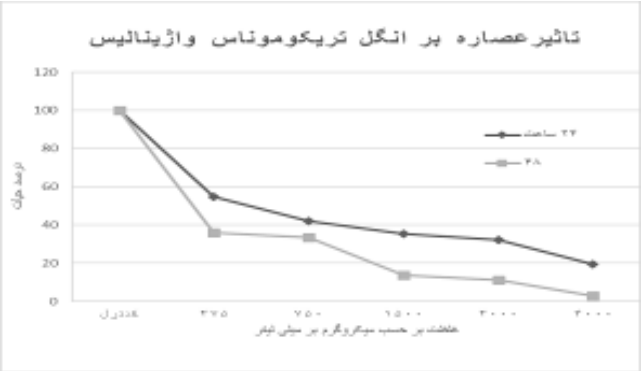
موثر بودن هر ترکیب دارویی بستگی به ایندکس درمانی آن دارد، به این معنی که دارو باید میکروارگانیسم را از بین برده و یا آن را مهار کند و از طرف دیگر فاقد سمیت باشد و یا اثر کمی بر سلولهای میزبان داشته باشد. بدین منظور شاخص ایندکس بصورت زیر محاسبه می‌شود (۲۹):

SI= CC50 Cell / IC50Tichomonas vaginalis

مقدار SI برای این عصاره برابر با µg/ml ۴/۱ می باشد (جدول۳).

جدول۱. درصد حیات تریکوموناس واژینالیس پس از مواجه با غلظتهای مختلف عصاره استونی گزروغن

غلظت(µg/lm)	۲۴ساعت	۴۸ ساعت
۳۷۵	۵۴/۸۳	۳۶/۱۱
۷۵۰	۴۱/۹۳	۳۳/۳۳
۱۵۰۰	۳۵/۴۸	۱۳/۸۸
۳۰۰۰	۳۲/۲۵	۱۱/۱۱
۴۰۰۰	۱۹/۳۵	۲/۷۷
کنترل	۱۰۰	۱۰۰



نمودار ۱. نمودار خطی درصد حیات انگل تریکوموناس واژینالیس در زمان‌ها (۲۴و ۴۸ ساعت) و غلظت‌های مختلف عصاره استونی گزروغن .

جدول ۲. درصد حیات سلول ماکروفاژ بعد از تیمار با عصاره استونی گزروغن

غلظت (µg/lm)	۲۴ ساعت
۳۷۵	۸۳/۶۷
۷۵۰	۷۳/۶۹
۱۵۰۰	۵۹/۲۴
۳۰۰۰	۴۹/۹۰
۴۰۰۰	۴۱/۰۴
کنترل	۱۰۰

جدول ۳. مقدار شاخص SI عصاره استونی گزروغن برانگل

ترکیب	IC50(µg/ml) ۲۴ساعت	CC50(µg/ml) ۲۴ ساعت	SI
عصاره استونی گزروغن	۶۸۲	۲۷۹۹	۴/۱

نتایج تاثیر عصاره بر قارچ کاندیدا آلبیکنس:

بعد از بررسی محیط های کشت در ۲۴و ۴۸ ساعت انکوباسیون، عصاره استونی در زمان ۲۴ ساعت در غلظت ۲ mg/ml ، در مقایسه با گروه کنترل ، عدم رشد را نشان داد اما در غلظتهای پایین تر عصاره، هیچ تفاوت معنی داری در میزان رشد قارچ نسبت به گروه کنترل، مشاهده نشد(شکل ۱) (جدول ۴).

شکل ۱. تاثیر عصاره استونی گزروغن بر کاندیداآلبیکنس .

در غلظت ۲ mg/ml، در زمان ۲۴ ساعت، بازدارندگی رشد صد در صد بر قارچ داشته است.

جدول ۴. درصد رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس پس از مواجه با غلظتهای مختلف عصاره استونی گزروغن

غلظت عصاره (mg/lm)	۲۴ساعت	۴۸ ساعت
۲	۰	۰
۱	۸۰	۹۵
۰/۵	۸۳/۶	۹۶/۵
۰/۲۵	۸۶/۵	۹۸
۰/۱۲۵	۸۸/۸	۹۹
۰/۰۶۲	۹۰/۵	۱۰۰
۰/۰۳۱	۹۲/۵	۱۰۰
۰/۰۱۵	۹۵	۱۰۰
۰/۰۰۷	۹۶/۷	۱۰۰
۰/۰۰۳	۹۸	۱۰۰
کنترل منفی (فاقد عصاره)	۱۰۰	۱۰۰
کنترل مثبت حاوی ایتراکونازول	۰	۰

نمودار ۲. نمودار درصد رشد کلنی های کاندیداآلبیکنس در زمان‌ها (۲۴و ۴۸ ساعت) و غلظت‌های مختلف عصاره استونی گزروغن .

بحث

مقاومت دارویی نسبت به داروهای رایج مورد استفاده و بنابراین افزایش دوز مصرفی داروها و به دنبال آن، افزایش عوارض جانبی داروها، باعث شده است که محققین به دنبال یافتن داروهایی با پایه ی طبیعی مانند گیاهان دارویی باشند که دارای عوارض جانبی بسیار کمتر هستند. تفاوت در ترکیبات حاصل از عصاره های بدست آمده از یک گیاه بعلت تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده میباشد و ترکیبات فنلی اغلب در حلال هایی که دارای قطبیت بیشتری هستند استخراج میشوند(۳۱). همچنین طی مطالعات مختلف انجام گرفته مشخص شده که در عصاره استونی نسبت به سایر عصاره ها، ترکیبات فنلی بیشتری استخراج شده است (۳۴-۳۲).

به دلیل وجود ترکیبات فنلی موجود در گیاه گزروغن، در مطالعه حاضر از استون ۸۰٪ به عنوان حلال استفاده گردید که بر اساس دانش ما برای اولین بار تاثیر این نوع عصاره بر تریکوموناس و کاندیدا بررسی شده است. نتایج حاصل از این مطالعه ، نشان دادکه با افزایش غلظت و مدت زمان مجاورت عصاره با انگل، درصد مهار کنندگی رشد(GI) به طور قابل توجهی افزایش می یابد؛ بدین صورت که بعد از ۲۴ ساعت دربالاترین غلظت عصاره یعنی ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ۸۰/۶۵ ٪ و بعد از ۴۸ ساعت، ۹۷/۲۳ ٪ (یعنی نزدیک ۱۰۰درصد) رشد انگل، مهار شده است. آنالیز داده‌ها در مورد تاثیر عصاره بر انگل، نشان دهنده این است که کاهش درصد حیات انگلها در تمامی غلظت‌ها و در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل، معنی دار ($P < ۰/۰۵$) بوده است.

میزان مهار رشد قارچ در این مطالعه در غلظت ۲ mg/ml پس از مدت زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل مثبت، ۱۰۰ درصد برآورد شده که در مقایسه با سایر غلظتها در زمانهای مذکور، تفاوت معنی دار بوده است ($P< ۰/۰۵$).

طبق بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۴، ترکیبات عصاره مورینگا پرگرینا با IC50 یک‌دهم میلی‌مولار علیه تریپانوزوما رودزینس اثر بازدارندگی مناسبی داشته است (۳۵).

در مطالعه دونلی و همکاران تاثیر عصاره آبی دانه های مورینگا در غلظتهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر بر قارچ بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که با افزایش غلظت عصاره، کاهش قابل توجهی در بروز قارچ مشاهده می شود از میان قارچهای متنوع بررسی شده، گونه های Mucor، بیشترین حساسیت ، Aspergillus niger و Rhizopus stolonifer کمترین حساسیت و Aspergillus flavus حساسیت متوسطی نسبت به عصاره داشتند (۳۶). در یک مطالعه تاثیر دانه های روغنی گزروغن بررسی شد که ازمیان میکروارگانیسم های مورد مطالعه،Candida glabrataکمترین مقاومت (MIC 3.25 mg/mL) وCandida albicans بیشترین مقاومت (MIC 5.70 mg/mL) را نسبت به عصاره داشتند(۳۷). ساترلند و همکاران (۱۹۹۰) گزارش دادندکه دانه مورینگا می تواند تکثیر باکتریوفاژها را مهار کند (۳۸).

Calzada و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر گیاهان دارویی مکزیکی را بر تروفوزوئیت‌های تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. از میان ۲۲ گیاه بررسی شده در این مطالعه عصاره گیاهان پاپایا و نارگیل بترتیب با مقدار IC50 ۶/۶ و ۵/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر و عصاره گیاه شمعدانی مکزیکی و گیاه خشخاش نیز با مقدار IC50 ۳۰/۹ و ۹/ ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اثر متوسطی بر تریکوموناس واژینالیس بوده‌اند (۳۹).

در یک مطالعه دیگر نعناع فلفلی و مریم گلی مورد بررسی قرار گرفت. نعناع فلفلی حاوی مانتول و تانن است .غلظت

های ۲، ۲/۵، ۴، ۵، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از گیاه مریم گلی و غلظت های ۴، ۵، ۸ و ۱۰میلی گرم بر میلی لیتر از گیاه نعناع فلفلی، مانع رشد انگل شد، اثر این عصاره ها روی تریکوموناس واژینالیس مشابه اثر مترونیدازول بوده است(۴۰).

کاظمیان و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که عصاره اکالیپتوس در غلظتهای ۶۰ تا ۹۰ میلی گرم در محیط کشت اثر قوی روی تریکوموناس واژینالیس داشت و اثر این گیاه مشابه مترونیدازول بوده است(۴۱).

Puc و همکاران در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضدتریکومونایی ۲۵ نوع جلبک دریایی شامل ۵ نوع فائوفیت، ۱۲ نوع رادوفیت و ۸ نوع کلروفیت را در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار دادند. مقدار IC50 گزارش شده در این مطالعه بین ۱/۳ تا ۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است که نشان دهنده فعالیت ضد تریکومونایی قوی عصاره گونه‌های مورد آزمایش قرار گرفته ، در این بررسی بوده است. IC50 محاسبه شده برای مترونیدازول ۰/۰۴میکروگرم بر میلی لیتر بوده است؛ SI بدست آمده برای مترونیدازول در این بررسی ۱۷۰۰ ، در حالی‌که بهترین مقدار SI محاسبه شده در گونه‌های جلبک‌ها مربوط به Agardhiella sp با مقدار ۱۲۹۳ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است که نشاندهنده کارآمدتر بودن مترونیدازول نسبت به این جلبک ها بوده است (۴۲).

در مطالعه ای که توسط بهاروند و همکاران در مورد تاثیر عصاره های انبه ، زغال اخته ، مترونیدازول و تینیدازول بر انگل تریکوموناس واژینالیس انجام گرفت نتایج نشان داد که در غلظت ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین بازدارندگی رشد را در زمان ۲۴ ساعت داشت و مقدار IC50 به ترتیب برابر با ۱۱۸/۳، ۶۰/۷۴، ۰/۰۴۲ و ۰/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است (۴۳).

نتیجه گیری

با توجه به اثر عصاره استونی گزروغن بر بازدارندگی رشد تریکوموناس واژینالیس و کاندیدا آلبیکنس ، امید آن می توان که با شناسایی و جداسازی ماده موثره این گیاه و انجام تحقیقات بیشتر، به طور همزمان ، برای درمان هر دوعفونت انگلی و قارچی (تریکومونیازیس و کاندیدیازیس) استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل پشتیبانی و حمایت بی دریغشان در مورد این مطالعه کمال تشکر را داریم.

References

1. Andrist LC. Vaginal Health and infections. JOGNN 2001;30:306-15.
2. French L, Horton J, Matousek M. Abnormal vaginal discharge: using office diagnostic testing more effectively. J Fam Pract 2004;53:805-14.
3. Ryan K, Berkowitz R, Barbieri R, Dunaif A. Kistner's Gynecology and woman Health. 7th ed. Mosby, 1999: 477-80.
4. *Baumslag N*, Michels DL. A women,s guide to geast infections. Rahmati B, Editors. Akhavan Publisher; Tehran, 2000: 42-8. [In Persian]
5. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Elsayed S. Invasive Candida species infections: a 5 year population-based assessment. J Antimicrob Chemother 2005;56:532-7.
6. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. Clin Microbiol Rev1998;11:300-17.
7. *Sood S, Kapil A. An update on Trichomonas vaginalis*. Indian J Sex Transm Dis 2008;29:7-14.
8. Soper D. Trichomoniasis: under control or undercontrolled?. Am J Obst Gynecol 2004;190:281–90.
9. Lazenby GB, Taylor PT, Badman BS, Mchaki E, Korte JE, Soper DE, et al. An association between Trichomonas vaginalis and high-risk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. Clin Ther 2014;36:38–45.
10. WestonT, Nicol C. Natural history of trichomonal infection inmales. Brit J Vener Dis 1963; 39:251-7.
11. Calzada F, Yépez-Mulia L, Tapia-Contreras A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on Trichomonas vaginalis trophozoites. J Ethnopharmacol 2007; 113:248–51.
12. Mabberley DJ. Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses. 3rd ed. Cambridge University Press, 2008; 1040.
13. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999;12:564 –82.
14. Karthy ES, Ranjitha P, Mohankumar A. Antimicrobial potential of plant seed extracts against Multidrug Resistant Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MDR – MRSA). Int J Bio 2009;1:34-40.
15. Alai E, Ghahreman, A. Notes on the distribution, climate and flora of the oil field areas, SW of Iran. Iran Int J Sci 2001;2:15-32.
16. Ghahreman A, Ramak Massoumi AA, Mozaffarian V. A new species of the genus Astragalus, Sect. Tricholobus (Leguminosae) from Iran. Iran J Bot 1998;4:109-10.
17. Zargari A. Medicinal Plants. 6th ed. Tehran University Publication; Tehran, 1996: 538.
18. Bennett RN, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, Dupont MS, Perkins L, et al. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees Moringa oleifera L. (horseradish tree) and Moringa stenopetala L. J Agric Food Chem 2003; 51: 3546–53.
19. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. Phytother Res 2007;21:17–25.
20. Furst, P. Antioxidative power of non-nutritive substances in foodstuffs. Ernahrung 1995;19: 457- 60.
21. Morton JF. The horseradish tree, Moringa pterigosperma [Moringaceae], a boon to arid lands. Econ Bot 1991;45: 318-33.

22. Ramachandran C, Peter KV, Gopalakrishnan PK. Drumstick (Moringa oleifera): a multipurpose Indian vegetable. Econ Bot 1980;34:276- 83.
23. Mekonnen Y, Yardely V, Rock P, Craft S. In vitro antitriptosomal activity of Moringa stenopetala leaves and roots. Phytother Res 1999; 13:538–9.
24. Elbatran SA, Abdel-Salam OM, Abdelshfeek KA, Nazif NM, Ismaeil SI, Hammouda FM. Phytochemical and pharmacological Investigations on *Moringa Peregrina* (Forssk) Fiori. Nat Prod Sci 2005;11:199–206.
25. El-Alfy TS, Ezzat SM, Hegazy SM, Amer AM, Kamel GM. Isolation of biologically active constituents from *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori (family: Moringaceae) growing in Egypt. Pharmacogn Mag 2011; 7:109–15.
26. Koheil MA, Hussein MA, Othman SM, El-Haddad A. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Moringa peregrina* seeds. Free Radic Antioxid 2011;1:49–61.
27. Cáceres A, Saravia A, Rizzo S, Zabala L, De Leon E, Nave F. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, anti-inflammatory and diuretic activity. J Ethnopharmacol 1992; 36:233–7.
28. Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-De-Sousa TM, Sônia N Báo, Kyaw CM, et al. Antimicrobial effect of farnesol, a Candida albicans quorum sensingmolecule, on Paracoccidioides brasiliensis growth and morphogenesis. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009;13:1-9.
29. Moo-puc R, Robledo D, Freile-pelegrin Y, Harvey J. Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonal activity. J Ethnopharmacol 2008;120:92–7.
30. Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. Cancer Treat Rev 2009; 35:57-68.
31. Jaffery E, Brown A, Kurilich A, Keek A, Matusheski N, Klein B. Variation in content of bioactive components in broccoli. J Food Compos Anal 2003;16:323–30.
32. Kallithraka S, Viguera CG, Bakker J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. Phytochemical Analysis 1995;6:265-7.
33. Liu Q, Yao H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chem 2007;102: 732-7.
34. Mamashloo S, Sadeghi Mahoonak AR, Ghorbani M, Alami M, Khomeiri M. The valuation of antioxidant properties and stability of phenolic compounds from medlar (Mespilusgermanica L.) fruit. JRIFST 2013; 1: 219-28. [In Persian]
35. Ayyari M, Salehi P, Ebrahimi SN, Zimmermann S, Portmann L, Krauth-Siegel RL, et al. Antitrypanosomal isothiocyanate and thiocarbamate glycosides from Moringa peregrina. Planta Medica 2014; 80: 86-9.
36. Donli P, Dauda H. Evaluation of aqueous Moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. Pest Manag Sci 2003;59:1060-2.
37. Lalas S, Gortzi O, Athanasiadis S, Tsaknis J, Chinou L. Determination of Antimicrobial Activity and Resistance to Oxidation of Moringa peregrina Seed Oil. *Molecules* 2012;*17*:2330-4.
38. Sutherland JP, Folkard GK, Grant WD. Natural coagulants for appropriate water treatment: a novel approach. Waterlines1990; 8: 30-2.
39. Calzada F, Lilian Y. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on Trichomonas vaginalis trophozoites. J Ethnopharmacol 2007;113:248–51.

40. Yousefi M, Taghipur S, Arefkhah N, Rahimian R, Davoudian A, Rafeiean M, et al. In-Vitro
Effect of Menthe Piperita and Salvia Officinalis Extracts on Trichomonas Vaginalis. J Isfahan Med Sch 2013; 31:811-8. [In Persian]
41. KazemianA, Yousofi DH, Zebardast N, Sereshti M, Banaeian S, Safdari F, et al. Effects of eucalyptus camaldulensis exracts on Trichimonas vaginalis growth in vitro. J Med Plant 2012; 11:116-20.
42. Moo-puc R, Robledo D, Freile-pelegrin Y, Harvey J. Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonal activity. J Ethnopharmacol 2008:30:92-7.
43. Baharvandi Z, Sadraei J. Comparison of the Effect of Metronidazole, Tinidazole, Mango and Blueberry Extracts on Trichomonas vaginalis in Vitro. Infect Epidemiol Med 2016;2:24-7.