BRIEF REPORT

In vitro Evaluation of Hydroalcoholic Leaf Extract of Chenopodium album on Growth of Trichomonase vaginalis

Hajar Ziaei Hezarjaribi[1],
Zohreh Momeni[2],
Mohammad Azadbakht[3],
Najmeh Nadeali[4]
Masoud Soosaraei[5],
Mahdi Fakhar[1],
Ogholniyaz Jorjani[6]

[1] Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran
[3] Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] M.Sc Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Ph.D Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

(Received Jan 9, 2016, Accepted May 1, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Trichomonas vaginalis*, is one the most common sexually transmitted diseases (STD) in women. Although metronidazole is the drug of choice for trichomoniasis, but due to its side effects attempts have been made to explore an alternative drug particularly with herbal source. Therefore, this study aimed to determine in vitro activity of hydroalcoholic extracts of *Chenopodium album (C. album*) leaf on the growth of *Trichomonas vaginalis.*

Materials and methods: The plant *(C.album)* was approved in herbarium and hydro-alcoholic extracts were prepared. The experiment was done using 24 wells cell culture plate. In each well, 200 µl of modified axenic TYM culture medium and 200 µl of different concentrations (5, 37, 75, 150, 300, 600, 1200 µg/mL) of the plant extract was added. They were incubated for 24 and 48 hours and then the plates were incubated at 37 ° C. The experiment was performed as a double blind design and in triplicate. Then growth inhibition percent (GI%) of the parasites was evaluated in both times and in different concentrations of plant leaf extract.

Results: Compared with metronidazole, the 600 and 1200 µg/mL concentrations of hydro alcoholic leaf extracts of *C. album* showed 96% and 100% inhibitory effects on the growth of trophozoeites of *T. vaginalis* in 48 hours, respectively.

Conclusion: *C. album* as an herbal native plant with ant-trichomonas activity is favorable and could be a candidate for in vivo researches on trichomoniasis in future.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, *Chenopodium album,* hydro alcoholic, in vitro

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(149):197-201(Persian).

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۹ خرداد سال ۱۳۹۶ (۲۰۱-۱۹۷)

ارزیابی برون تنی اثرات عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه سلمه [*Chenopodium album*] بر رشد *تریکوموناس واژینالیس*

هاجر ضیایی هزار جریبی[۱]
زهره مومنی[۲]
محمد آزادبخت[۳]
نجمه نادعلی[۴]
مسعود سوسرایی[۵]
مهدی فخار[۶]
اوغل نیاز جرجانی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: *تریکوموناس واژینالیس* یکی از شایع‌ترین عفونت‌های منتقله از طریق تماس جنسی در زنان می‌باشد. اگرچه مترونیدازول داروی انتخابی برای درمان تریکومونیازیس است، اما به دلیل عوارض جانبی ناشی از این دارو، تلاش برای یافتن یک داروی جایگزین به ویژه با منشا گیاهی، اهمیت فراوانی دارد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سلمه بر رشد تریکوموناس واژینالیس در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش‌ها: پس از تایید گیاه سلمه در هرباریوم، عصاره هیدروالکلی برگ گیاه تهیه شد. هم چنین انگل تریکوموناس واژینالیس در محیط اگزنیک TYM (Trypticase-Yeast-Maltose) تغییر یافته کشت داده شد. سپس اثر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سلمه در غلظت‌های مختلف (۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. تمام مراحل آزمایش به صورت دو سویه کور (double blind) و سه مرتبه انجام شدند و درصد مهار رشد انگل در غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه مورد نظر و هر دو زمان مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه سلمه با غلظت ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت، به ترتیب ۹۶ درصد و ۱۰۰ درصد رشد تریکوموناس واژینالیس را در مقایسه با مترونیدازول مهار می‌نماید.

استنتاج: گیاه بومی سلمه را می‌توان به عنوان یک گیاه دارویی دارای خواص ضد تریکومونایی مطلوب معرفی نمود. لذا این گیاه می‌تواند یک انتخاب مناسب برای انجام تحقیقات دارویی آینده در شرایط درون تنی باشد.

واژه های کلیدی: تریکوموناس واژینالیس، گیاه سلمه، عصاره هیدرو الکلی، شرایط آزمایشگاهی

مقدمه

تنوع بسیار زیاد و وفور ترکیبات دارای خواص درمانی در گیاهان سبب شده تا از آن‌ها بتوان به عنوان یک منبع مهم به منظور جستجوی عوامل جدید دارویی و ساخت داروهای ضد میکروبی و انگلی از جمله

مولف مسئول: مهدی فخار- ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد،مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران Email: mahdif53@yahoo.com
۱. دانشیار گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی وملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری،ایران
۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم-دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران
۳. استاد گروه فارماکنوزی، دانشکده داروسازی-دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشجوی دکتری انگل شناس، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. استادیار انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان ،ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۰/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۱/۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۲/۱۱

تریکوموناس وازینالیس استفاده نمود(۱، ۲). گیاه سلمه یا سلمک با نام علمی *Chenopodium album* گیاهی دو لپه و یک ساله می‌باشد که به عنوان یک علف هرز شناخته می‌شود و ارتفاع آن به ۳۰ تا ۱۸۰ سانتی‌متر می‌رسد. تقریباً تمامی قسمت‌های سلمه از جمله برگ، ساقه‌های جوان، اندام‌های رویشی و عصاره دارای خواص درمانی از قبیل ضدالتهاب، ضد دردهای مفصلی، ملین و غیره می‌باشد(۳). تریکومونیازیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انگلی منتقله جنسی در جهان با عامل *تریکوموناس واژینالیس* (ت. واژینالیس) می‌باشد. به طور کلی میزان شیوع بیماری تریکومونیازیس در گروه‌های مختلف سنی زنان در ایران ۸ درصد برآورد شده است(۴). این میزان تا ۳۰ درصد در جمعیت‌های پرخطر افزایش می‌یابد(۵). برای تریکومونیازیس درمان‌های متفاوتی وجود دارد و از مهم‌ترین درمان‌های این بیماری می‌توان به استفاده از مترونیدازول اشاره کرد. با توجه به عوارض دارو و مقاومت های دارویی به وجود آمده علیه این بیماری نیاز به یک دارو با اثر بخشی بالا و بدون هرگونه عوارض جانبی برای درمان این بیماری وجود دارد(۶). در این مطالعه با توجه به نتایج سایر تحقیقات مبنی بر خواص ضد انگلی و میکروبی گیاه سلمه، اثر عصاره هیدروالکلی برگ این گیاه بومی ایران بر روی ت. واژینالیس برای نخستین بار در شرایط برون تنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

سوش ت. واژینالیس (شماره دسترسی KU551910.1) جدا شده از بیمار که در بانک نمونه‌های انگلی بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی ساری نگهداری می‌شود، در محیط اگزنیک TYM (TrypticaseYeastMaltose) تغییر یافته (تهیه شده در آزمایشگاه بخش انگل شناسی) کشت داده شد.

الف :تهیه عصاره

گیاه سلمه از استان مازندران تهیه و در هرباریم بخش فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی مورد تایید قرار گرفت. سپس از برگ های این گیاه، عصاره هیدروالکلی تهیه گردید(۲). سپس با اضافه کردن آب مقطر، غلظت های مورد نیاز تهیه شدند.

ب: ارزیابی عصاره هیدروالکلی

جهت انجام آزمایش از پلیت‌های استریل ۲۴ خانه‌ای استفاده شد. برای دقت بیش‌تر، هر کدام از رقت‌های عصاره تهیه شده در ۲ چاهک انجام و آزمایش ۳ بار تکرار گردید. در همه ۲۴ خانه، ۲۰۰ میکرولیتر TYM ریخته شد. سپس لوله حاوی انگل که تعداد انگل‌ها را به کمک لام نئوبار شمارش و به ۵۰۰ هزار عدد در میلی‌لیتر رسانده و کاملاً تکان داده تا یکنواخت شود و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به همه چاهک‌ها اضافه شد. پودر عصاره گیاهی را به کمک آب مقطر استریل حل و به غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تنظیم و پس از فیلتر کردن اضافه شد. برای بررسی اثر ضد تریکوموناسی گیاه، غلظت‌های ۳۷/۵، ۷۵، ۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه و آزمایش شد. رقت‌های عصاره گیاهی و داروی مترونیدازول به کمک PBS استریل با PH=6.4 تهیه گردید. برای شاهد مثبت، به جای عصاره گیاهی ۵۰ میکرولیتر مترونیدازول با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد. جهت شاهد منفی، فقط محیط کشت حاوی انگل به چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد(۲). برای بررسی میزان رشد انگل طی ۲۴ و ۴۸ ساعت، پس از اطمینان از مخلوط شدن چاهک‌ها به روش پیپتینگ، ده میکرولیتر از هر چاهک برداشته، تعداد انگل با لام نئوبار شمارش شد. برای این که ضریب خطای آزمایشگاهی و انسانی به حداقل برسد، آزمایشات به صورت دو سوکور و سه مرتبه انجام گردید و میانگین شمارش انگل در این سه مرتبه به

عنوان نتیجه، گزارش شد. در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، تحرک و زنده بودن انگل‌ها با رنگ تریپان بلو بررسی گردید. فاکتورهای بررسی عبارت از زمان تاثیر، غلظت تاثیر، تعداد انگل در هر مرحله، زنده بودن و تحرک انگل می‌باشد. نتایج شمارش انگل به صورت درصد مهار رشد (GI , growth inhibition) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید(۲).

$$GI_{growth} = \frac{a-b}{a} \times 100$$

در این فرمول، a تعداد انگل زنده در میکروتیوپ شاهد منفی و b تعداد انگل زنده در میکروتیوپ حاوی عصاره می‌باشد. برای مقایسه میانگین تعداد انگل های شمارش شده از آزمون ANOVA و نسخه SPPSS ۱۲ استفاده شد.

یافته ها و بحث

گیاه سلمه توانست در غلظت های ۱۲۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۴۸ ساعت به ترتیب باعث مهار ۱۰۰ و ۹۶ درصدی رشد انگل در مقایسه با شاهد مثبت (داروی انتخابی مترونیدازول) شود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: بررسی میزان تاثیر غلظت های مختلف گیاه سلمه بر مهار رشد *تریکوموناس واژینالیس* طی زمان های مختلف

غلظت های عصاره گیاه و مترونیدازول (میکروگرم/میلی لیتر)	مهار رشد انگل (۲۴ ساعت) (درصد)	مهار رشد انگل (۴۸ ساعت) (درصد)
شاهد منفی	-	-
شاهد مثبت (مترونیدازول)	۱۰۰	۱۰۰
۳۷/۵	۴۴	۷۵
۷۵	۵۵	۷۹
۱۵۰	۶۱	۸۴
۳۰۰	۶۸	۹۲
۶۰۰	۷۷	۹۶
۱۲۰۰	۹۱	۱۰۰

در این مطالعه مشخص شد که انگل در محیط کشت TYM تا ۷۲ ساعت به صورت متحرک زنده می‌ماند ولی در حضور داروی مترونیدازول تنها ۲ ساعت زنده می‌ماند. تمامی غلظت‌های به کار رفته عصاره سلمه در این مطالعه قادر به کاهش زمان زنده بودن تریکوموناس و سبب از بین رفتن انگل شد، گرچه این زمان برای غلظت‌های مختلف متفاوت بود. ولی در غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت، اثری مشابه با مترونیدازول بر ت. واژینالیس داشت، گرچه برای سایر غلظت‌های به کار رفته علی‌رغم کاهش تعداد انگل، اثری مشابه با مترونیدازول نداشت. ولی روند کاهش تعداد تریکوموناس قابل ملاحظه بوده است.

در مطالعه حاضر، از عصاره هیدروالکلی برگ سلمه استفاده شد. ملک پور و همکاران نشان دادند که عصاره آبی ریشه گیاه سلمه اثرات ضد کاندیدایی مشابه با فلوکونازول دارد(۷). در مقالات متعدد، خواص ضد قارچی، آنتی‌آفلاتوکسینی، آنتی‌اکسیدانی، خواص ضد مالاریایی و ضد کرمی گیاه سلمه گزارش شده است(۱۲-۸). هم‌چنین مطالعه ما نشان داد که در شرایط برون تنی، اثر عصاره وابسته به دوز و غلظت است، به‌طوری که در غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت، اثری مشابه با مترونیدازول بر ت. واژینالیس داشت. با توجه به این که گیاه سلمه دارای فراکشن‌های مختلفی است، بنابراین در بررسی‌های آینده، پس از تعیین فراکشن گیاه و بررسی سایتوتوکسیسیتی روی ماکروفاژها، می‌توان اثر درون‌تنی آن را بر ضد تریکوموناس واژینالیس با توجه به نتایج آزمایشگاهی آن انجام داد. در مجموع گیاه بومی سلمه را می‌توان به عنوان یک گیاه دارویی دارای خواص ضد تریکومونایی مطلوب معرفی نمود، اگر چه انجام تحقیقات بیش‌تر در این خصوص ضروری است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خاطر حمایت‌های مالی و معنوی طرح شماره ۹۱-۱۵۸ قدردانی می‌شود.

References

1. Silva NC, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of th eir antimicrobial activity J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2010; 16(3): 402-413.
2. Ziaei Hezarjaribi H, Momeni Z, Azadbakht M, Rahimi Esboei B, Fakhar M, Akbarian M. Effects of Hydroalcoholic Extract of Saponaria officinalis Leaf on Growth of Trichomonas vaginalis In Vitro. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 25 (134): 52-59.
3. Morteza-Semnani K. A Review on Chenopodium botrys L.: traditional uses, chemical composition and biological activities. mazums-pbr. 2015; 1(2): 1-9
4. Johnston VJ, Mabey DC. Global epidemiology and control of trichomonas vaginalis. Curr Opin Infect Dis 2008; 21(1): 56-64.
5. Hezarjaribi H Z, Fakhar M, Shokri A, Hosseini Teshnizi S, Sadough A, Taghavi M. Trichomonas vaginalis infection among Iranian general population of women: a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res 2015; 114(4): 1291-1300.
6. Workowski KA, Berman SM. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted disease treatment guidelines. Clin Infect Dis. 2011; 53(supp3):59-63.
7. Malekpou A, Delnavaz Hashemlouian B. Evaluation of the Antimicrobial Effects of the Alcoholic and Aqueous Extracts of Chenopodium Album and Chenopodium Botrys against Candida Albicans. TJPM 2016; 1(3): 33-40.
8. Jardim CM, Jham GN, Dhngra OD. Freier,M.M Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian Chenopodium ambrosioides. L J Chem Ecol 2008; 34(9): 1213-1218.
9. Kumar R, Kumar MA, Dubey NK, Tripathi YB. Evaluation of Chenopodium ambroisioides oil as a potential source of antifungal,antiaflatoxigenic and antioxidant activity. Int J Food Microbiol. 2007; 115 (2): 159-164.
10. Potawale SE, Luniya KP, Mantri RA, Mehta UK. Waseem MD, Sadiq MD, et al. Chenopodium ambrosioides:An ethnopharmacological review. Pharmacology online 2008; 2: 272-286.
11. Kishore N, Chansouria JPN, Dubey NK. Antidermatophytic action of the essential oil of Chenopodium ambrosioides and an ointment prepared from it. India Phytother Res .1999; 10 (5): 453-455.
12. Chekem MS, Lunga PK, Tamokou JD, Kuiate JR, Tane P, Vilarem G, etal. Antifungal properties of Chenopodium ambrosioides essential oil against Candida species. Pharmaceuticals. 2010;3(9):2900-2909.