

In vitro Anti-*Trichomonas* Effects of the Essential Oil and Nano-emulsion of *Rosmarinus officinalis* on *Trichomonas vaginalis*

Hajar Ziaei Hezarjaribi¹,
Najmeh Nadali²,
Majid Saeidi³,
Zohreh Momeni⁴,
Masoud Soosaraei⁵,
Mahdi Fakhari¹,
Oghol Niaz Jorjani⁶

¹ Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² MSc Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Pharmaceutics, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

⁵ PhD Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Parasitology, Laboratory Science Research Center, Faculty of Paramedical, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

(Received Jan 17, 2017, Accepted August 28, 2017)

Abstract

Background and purpose: There is an increasing rate of drug resistance against trichomoniasis and current drugs used in treatment of this disease have many side effects, therefore, attempts have been made to explore alternative drugs favorably from natural sources. The present study aimed at evaluating the anti-*Trichomonas* effect of essential oil and that of nano-emulsion of *Rosmarinus officinalis* on the growth of *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) in vitro.

Materials and methods: *T. vaginalis* reference strains were cultured in modified TYM medium. The components of rosemary essential oil were determined by gas chromatography. In addition, cytotoxicity effects of essential oils and nano-emulsions prepared from this plant were evaluated against macrophage cell line (J774.A.1). Serial concentrations of 10, 25, 50, and 100 ($\mu\text{g/mL}$) were prepared from rosemary essential oil and nano-emulsion. Then growth inhibition rate of the parasites in different concentrations was done in triplicate within 1, 2, and 3 hours.

Results: Rosemary essential oil and nano-emulsion had an inhibitory effect on the growth of *Trichomonas* and concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ showed growth inhibition effect of 96.1% and 100% throughout 1, 2 and 3 hours, respectively. Additionally, cytotoxicity assay against macrophage revealed no toxicity on the cells at 100 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusion: According to the suitable anti-trichomonas activity of rosemary, this plant could be considered as a good candidate in treatment of *Trichomonas* infection, after complementary studies on animal model.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, *Rosmarinus officinalis*, essential oils, nano-emulsion, in vitro

اثرات ضد تریکومونایی اسانس و نانو امولسیون گیاه رزماری بر تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی

هاجر ضیایی هزار جریبی¹

نجمه نادعلی²

مجید سعیدی³

زهره مومنی⁴

مسعود سوسرایبی⁵

مهدی فخار⁶

اوغل نیاز جرجانی⁷

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به افزایش موارد مقاومت دارویی و عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای رایج در بیماری تریکومونیاژیس، تلاش برای یافتن داروی جایگزین به ویژه با منشأ طبیعی ضروری است. لذا مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثرات ضد تریکومونایی اسانس و نانو امولسیون گیاه رزماری بر تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که به صورت برون تنی انجام شد سوش استاندارد تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت TYM تغییر یافته کشت داده شد. ترکیبات موجود در اسانس رزماری با گاز کروماتوگرافی مشخص و برای تعیین سمیت سلولی، از سلول‌های ماکروفاژ رده J774.A.1 استفاده شد. ارزیابی میزان مهار رشد انگل با تهیه غلظت‌های سریالی 10، 25، 50، 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس و نانو امولسیون رزماری طی 1، 2 و 3 ساعت با سه بار تکرار انجام شد.

یافته‌ها: اسانس و نانو امولسیون رزماری اثر مهار بر رشد تریکوموناس داشت و در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر در طول سه ساعت به ترتیب 1/96 درصد و 100 درصد مهار رشد را نشان داد. هم‌چنین اشکال اسانس و نانو امولسیون در این غلظت بر روی ماکروفاژها هیچ‌گونه سمیتی نداشته‌اند.

استنتاج: با توجه به اثرات مطلوب ضد تریکومونایی اسانس و نانو امولسیون گیاه رزماری این گیاه، می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسبی جهت ارزیابی اثرات درمانی بر روی مدل حیوانی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: تریکوموناس واژینالیس، رزماری، اسانس، نانو امولسیون، برون تنی

مقدمه

واژینالیس (ت واژینالیس) در ایران حدوداً بین 37-1 درصد برآورد می‌شود (2). داروی انتخابی برای درمان این بیماری مترونیدازول می‌باشد ولی گزارشات حاکی

تریکومونیاژیس با عامل ت واژینالیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای منتقله از راه جنسی است (1). بر اساس مطالعات مختلف شیوع تریکوموناس

Email: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری کیلومتر 18 جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

1. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استاد، گروه فارماکوسیتیکس، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استاد بار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

5. دانشجوی دکتری انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

6. استاد بار، گروه انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: 1395/10/28 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1396/5/28 تاریخ تصویب: 1396/6/6

مازندران تهیه و غلظت‌های سریالی 10، 25، 50 و 100 میکرو گرم بر میلی‌لیتر اشکال اسانس و نانو امولسیون آماده‌سازی شد. نانو امولسیون‌های روغن در آب با استفاده از نسبت وزنی 1 درصد اسانس و اسپان 60 و توین 80 به روش سونیکاسیون تهیه شد. شدت و زمان‌های مختلف بررسی و در نهایت حالت بهینه از نظر اندازه و پتانسیل زتا انتخاب شد (13). اجزای عمده تشکیل‌دهنده اسانس رزماری با استفاده از تکنیک گاز کروماتو گرافی تعیین گردید (14). اندازه ذرات نانو امولسیون تهیه شده به وسیله دستگاه DLS (Dynamic Light Scattering) تعیین گردید که اندازه ذرات $7/98 \pm 4/6$ نانومتر بود.

پس از تهیه غلظت‌های سریالی تمام مراحل آزمایش بر اساس مطالعه ضیایی و همکاران در سال 2017 انجام گرفت (15). برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه و نسخه 22 نرم افزار SPSS استفاده شد.

بدین منظور از ماکروفاژهای رده سلولی J774.A.1 استفاده شده و با روش رنگ سنجی MTT میزان سمیت سلولی اسانس و نانو امولسیون رزماری محاسبه گردید (16).

یافته ها و بحث

نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان مهار رشد به طور معنی‌داری، در غلظت 100 میکرو گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب 96/1 و 100 درصد در ساعت سوم بود ($P > 0/0001$). هم‌چنین مقایسه غلظت 100 میکرو گرم بر میلی‌لیتر اسانس و نانو امولسیون گیاه رزماری نشان داد که در ساعت اول و دوم اسانس رزماری اثر مهاری بیش‌تری نسبت به نانو امولسیون دارد اما در ساعت سوم نانو امولسیون بهتر از اسانس اثر مهاری خود را انجام داد. مطالعات اخیر حاکی از آن است که گیاه رزماری به واسطه داشتن ترکیبات فنلی، می‌تواند در از بین بردن عوامل عفونی از قبیل باکتری، قارچ و انگل

از روند رو به رشد مقاومت دارویی، عوارض جانبی فراوان آن (خصوصاً در سه ماهه اول بارداری) محققان را بر آن داشت تا به جستجوی دارویی با عوارض جانبی کمتر، ارزان‌تر و در دسترس پردازند (3). در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه محققان قرار گرفته است (4). تاکنون مطالعات زیادی در مورد اثرات ضد تریکومونایی گیاهان مختلف انجام گرفته است (8، 5).

رزماری (*Rosmarinus officianalis* L) گیاهی است از خانواده نعناع که بومی مدیترانه بوده و در ایران نیز کشت می‌شود. خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارویی به خوبی شناخته شده است (9، 10). در سال‌های اخیر به اثرات ضد انگلی اشکال نانویی گیاهان مختلف دارویی از جمله نانو امولسیونها توجه ویژه‌ای شده است. زیرا نانو امولسیونها به منظور حفظ ماهیت دارو در گردش خون، محدود ساختن دسترسی دارو به محل اختصاصی برای اعمال اثر و رساندن مقدار قابل تحمل و مورد نیاز در آن محل به کار می‌روند (11). در مجموع با توجه به مطالب پیش‌گفت در مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات ضد ت واژینالیس اشکال اسانس و نانو امولسیون گیاه رزماری در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی که به صورت برون‌تنی انجام شد، سوش استاندارد ت واژینالیس (شماره دسترسی Ku 551910,1) جدا شده از بیمار (موجود در بانک نمونه‌های انگلی آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی ساری)، در محیط اگزیک- (Trypticase) Yeast-Maltose (TYM complete) اصلاح شده و در دمای 37 درجه کشت و پاساژ داده شد (12). اسانس گیاه رزماری از شرکت داروسازی باریج اسانس و نانو امولسیون، در گروه داروسازی دانشگاه علوم پزشکی

مطالعه و استفاده از قسمت‌های مختلف گیاه (برگ، گل و غیره) نیز بر روی خواص ضد میکروبی تاثیر دارد (14، 10). به‌طور کلی از آنجایی که بر اساس مطالعات مختلف خواص ضد میکروبی، ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی اسانس رزماری تایید شده است، بنابراین با توجه به اثرات مطلوب ضد تریکومونایی گیاه رزماری در شرایط آزمایشگاهی، ارزیابی اثرات درمانی این گیاه بر روی مدل‌های حیوانی توصیه می‌شود (17، 10، 4).

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره 1543 و بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نجمه نادعلی است که هزینه‌های آن توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مفید باشد (18، 17). در مطالعه حاضر نیز، علاوه بر غلظت، زمان هم اهمیت داشت و با افزایش زمان مجاورت، میزان کشندگی مشابه با کنترل مثبت بود و بیش‌ترین اثر در ساعت سوم بود که نسبت به مطالعه ضیایی و همکارانش در سال 2006 زمان طولانی‌تری می‌باشد که این امر می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد (5). ممکن است این اختلاف ناشی از به کارگیری اشکال مختلف عصاره و یا اسانس و یا فرم امولسیون گیاهان دارویی باشد و احتمالاً فرآورده‌های ضد تریکومونایی آزاد شده گیاهان فوق در فرم عصاره متانولی بیش‌تر از فرم اسانس آن باشد (19). همان‌طوری که در این طرح نیز اثر نانو امولسیون گیاه رزماری بهتر از فرم اسانس آن عمل کرد. در یک بررسی اثر ضد تریکومونایی گیاه اوکالیپتوس در ممانعت از رشد بعد از 24 ساعت و در مطالعه دیگری بعد از 72 ساعت گزارش شده است (19، 18). هم‌چنین گونه گیاه مورد

References

1. Johnston VJ, Mabey DC. Global epidemiology and control of trichomonas vaginalis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(1): 56-64.
2. Ziaei Hezarjaribi H, 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.
3. Forna F, Gulmezoglu AM. Interventions for treating trichomoniasis in women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; (2):CD000218.
4. Silva NC, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxin Incl Trop Dis*. 2010; 16(3):402-413.
5. Ziaei H, Azadbakht M, Abdollahi F, Shabankhani B. Effect of Methanolic extracts of *Artemisia aucheri* Boiss, *Zataria multiflora* Boiss and *Myrtus communis* L. on *Trichomonas vaginalis* (In Vitro). *J Gorgan Uni Med Sci* 2006; 8 (1) :34-38.(persian)
6. Sarkari B, Tadayon H, Askarian S, Farnia E, Askarian M. In Vitro anti-Trichomonas activity of *Freula assafoetida* and garlic extracts. *J Gorgan Uni Med Sci* 2009; 11 (3) :13-17.(persian)
7. Rafieian M, Hejazi SH, Yusefi HA, Yektaian N, Shirani-Bidabadi L. Effect of *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium* & *Juglans regia* leaves

- extracts on *Trichomonas vaginalis*, in vitro. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2011;12(4):62-69.(persian)
8. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogen* 2004; 25(4): 549- 557.
 9. Zargari A. Medicinal Plants . Tehran. Tehran University Pub: 1990.(persian)
 10. Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem* 2008; 108(3):1019-1022.
 11. Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. 2010, 31;81(7):680-689.
 12. 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.(persian)
 13. Mirmajidi Hashtjin A, Abbasi S. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocoll*. 2015;44:40-48.
 14. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. USA, Allured Business Media: 2009.
 15. Ziaei Hezarjaribi H, Momeni Z, Azadbakht M, Rahimi Esboei B, Fakhar M, Akbarian M, et al. In vitro evaluation of hydroalcoholic leaf extract of *Chenopodium album* on growth of *Trichomonas vaginalis*. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(149):197-201.(persian)
 16. Shokri A, Emami S, Fakhar M, Teshnizi SH, Keighobadi M. In vitro antileishmanial activity of novel azoles (3-imidazolylflavanones) against promastigote and amastigote stages of *Leishmania major*. *Acta Trop*. 2017; 167:73-78.
 17. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem* .2007;55(19): 7879–7885.
 18. Tavassoli S, Mousavi M, Emam-Djomeh Z, Razavi SH. Comparative study of the antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil and methanolic extract. *Middle-East J Sci Res* 2011;9(4): 467-471.
 19. Kazemian A, Yousofi Darani H, Zebardast N, Sereshti M, Banaian S, et al. Effects of *Eucalyptus camaldulensis* extracts on *Trichomonas vaginalis* growth in vitro. *JMP*. 2012;11(suppl9):116-120.(persian)