



بررسی اثر اسانس اژنول روی تک‌یاخته تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاهی و تجربی

عبدالله خاکی^۱، محمد رضا یوسفی^{۲*}، نادیا طائفی نصر آبادی^۱

۱- گروه انگل‌شناسی دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۲- گروه انگل‌شناسی دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۶ آبان ۱۴۰۲، بازنگری: ۲۵ آذر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۰۵ دی ۱۴۰۲



10.22034/nfvm.2024.425486.1212

چکیده

در این مطالعه اثرات اسانس اژنول که ماده‌ی مؤثر گیاه میخک می‌باشد روی انگل تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاهی و تجربی مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مطالعه آزمایشگاهی از محیط کشت تغییر یافته دیاموند استفاده شد. نمونه انگل از چینه‌دان کبوتر آلوده به این انگل تهیه شد. پس از کشت انگل به دو گروه: گروه یک بدون تیمار یا گروه کنترل و گروه دو، گروه تیمار شده با اسانس اژنول تقسیم شد و برای انجام این مطالعه از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. محیط کشت حاوی انگل و اسانس اژنول به این پلیت‌ها اضافه شد و در نهایت غلظت ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس اژنول به دست آمد و در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با اژنول تعداد تک‌یاخته تریکوموناس گالینه زنده و مرده محاسبه شد. در مطالعات تجربی تعداد ۶۰ کبوتر به گروه‌های تیمار با اسانس اژنول ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم و گروه کنترل تقسیم شد و سپس هر روز تا ۵ روز روزی یک‌بار به صورت خوراکی تحت درمان قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد در مطالعات آزمایشگاهی اسانس اژنول در دوز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بعد از گذشت ۴۸ ساعت سبب مرگ کامل انگل تریکوموناس گالینه می‌شود. در مطالعات تجربی نشان می‌دهد ۵ روز پس از درمان با اسانس اژنول ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن هیچ انگل تریکوموناس گالینه زنده‌ای در این کبوتر مشاهده نمی‌شود. در نتیجه این مطالعات نشان می‌دهد که اسانس اژنول می‌تواند روی انگل تریکوموناس گالینه مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: اژنول، تریکوموناس، کبوتر

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: youssefi929@hotmail.com

مقدمه

تریکوموناس گالینه، انگل تاژکدار متعلق به خانواده تریکومونادیده است و بیماری تریکومونیاژیس در پرندگان را ایجاد می‌کند. این انگل جراحی را در قسمت ابتدایی دستگاه گوارش و گاهی اوقات در قسمت دستگاه تنفسی ایجاد می‌کند (۵، ۲۹). شدت جراحات بروز این بیماری می‌تواند به شکل تحت بالینی و یا گاهی اوقات شدت جراحات به قدری شدید است که سبب مرگ پرنده به دلیل انسداد مری و گرسنگی می‌شود (۱۲). بیماری تریکومونیاژیس به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم کاهش جمعیت کبوتر است (۳۵، ۲۸). نیتروایمیدازول‌ها برای درمان بیماری تریکومونیاژیس به‌کار می‌رود. به دلیل تجویز بی‌رویه نیتروایمیدازول‌ها و استفاده از این داروها در پیشگیری از تریکومونیاژیس مقاومت دارویی در انگل شکل گرفته است (۲۳). در میان نیتروایمیدازول‌ها، مترونیدازول به‌طور گسترده بر علیه انگل تریکوموناس گالینه به‌کار می‌رود (۸، ۱۴، ۴). به هر حال به دلیل خطر سرطان‌زا بودن (۳۴) و همچنین مقاومت دارویی (۱۰) در مقابل مترونیدازول یافتن داروی جایگزین برای مقابله با این انگل مهم می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از اسانس و عصاره گیاهان به‌عنوان درمان جایگزین تریکومونیاژیس استفاده شده است (۳۸، ۳۲، ۳۱، ۱۶، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳).

گرچه تحقیقات زیادی روی خاصیت ضد تریکومونیاژیس عصاره و اسانس گیاهی انجام پذیرفته است با این حال به دلیل تنوع ترکیبات شیمیایی گیاه به‌علت منطقه جغرافیایی و زمان برداشت (۱۵)، خیلی از این ترکیبات گیاهی وارد بازار نشده‌اند برای حل این مشکل در این مطالعه ترکیبات فعال گیاه همانند گیاه میخک که ترکیب اسانس اژنول ترکیب اصلی این گیاه است، برای بررسی خواص ضد تریکوموناسی استفاده شده است.

اسانس اژنول مایع بدون بو و زردرنگ متعلق به ترکیبات فنوله بوده و ترکیب اصلی گیاه میخک می‌باشد

(۲۶). مطالعات مختلف خاصیت ضد جرب، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد نماتودی و ضد حشرات این ترکیب را نشان می‌دهد (۳، ۹، ۱۳). خاصیت ضد تک‌یاخته‌ای این ترکیب روی شپستوزوما (۷)، لشمانیا (۲۷)، ژیاودی (۴۳) و تریبونوما (۴۱) گزارش شده است.

مطالعه حاضر جزو اولین مطالعاتی است که اثر اژنول روی انگل تریکوموناس گالینه را در شرایط آزمایشگاهی و تجربی مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

اسانس اژنول: ترکیب اژنول برای انجام این مطالعه از شرکت سیگما و با غلظت ۹۹٪ مربوط به کشور آلمان تهیه شد.

محیط کشت دیاموند: برای انجام این مطالعه از محیط کشت تغییر یافته دیاموند استفاده شد که اجزای تشکیل‌دهنده این محیط کشت به شرح زیر می‌باشد: ابتدا ۸۸۰ سی‌سی آب مقطر درون یک بشر ریخته شده و مقادیر ذکر شده تریپتون، عصاره مخمر، گلوکز، سدیم کلراید، ال-سیستین، سدیم تیوگلاپیکولات، آگار توسط ترازو طبق پروتکل محیط کشت توزین شده و در داخل آب مقطر ریخته می‌شود و در مرحله بعد با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت نیم ساعت این ترکیبات با هم مخلوط می‌شوند. پس از مخلوط شدن در حالت طبیعی pH این محلول در حدود ۵/۶-۵/۳ می‌باشد که با افزودن سود سوزآور pH این محلول را به محدوده ۶/۹-۷/۱ می‌رسانیم. پس از تنظیم pH ادامه مراحل زیر هود استریل و در کنار شعله صورت می‌گیرد و در این مرحله پنی‌سیلین جی، جنتامایسین و آمفوتریسین بی هم به محیط کشت اضافه شده و در نهایت سرم غیر فعال شده و استریل اسب اضافه شد و در پایان برای استریل کردن محیط کشت ساخته شده را از فیلتر سرسرنگی به قطر ۰/۲۲ میکرومتر عبور دادیم و در فالكون‌های استریل به میزان ۱۰ سی‌سی بسته‌بندی شد و محیط کشت‌ها باید به دور از نور و در دمای یخچال نگهداری شدند.

بررسی اثر اسانس اژنول روی تک‌یاخته تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاهی

انگل تریکوموناس گالینه: انگل تریکوموناس گالینه

از کبوتران آلوده و با استفاده از تکنیک اسمیر مرطوب و پس از بررسی اسمیر مرطوب چینه‌دان کبوتر آلوده زیر میکروسکوپ نوری و تأیید انگل تریکوموناس گالینه تهیه شد. نمونه‌های انگل تریکوموناس از چینه‌دان کبوتر آلوده با استفاده از گاوآژ چینه‌دان به دست آمد و سپس به محیط کشت انگل که محیط کشت دیاموند اصلاح شده است انتقال می‌یابد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۳۰) و هر ۴۸ ساعت و پس از رشد لگاریتمی انگل که به تعداد ۱۰۰۰۰ انگل در هر میلی‌لیتر محیط کشت رسید دوباره به محیط کشت جدید انتقال یافت (۳۳).

مطالعات آزمایشگاهی: برای انجام مطالعه از پلیت

۹۶ خانه استریل برای انکوباسیون تروفوزوایت انگل تریکوموناس گالینه با اسانس اژنول استفاده شد. زمانی که محیط کشت حاوی انگل تعداد تروفوزوایت انگل تریکوموناس گالینه به 1×10^4 رسید به چاهک‌ها اضافه شد. برای انجام رقت‌سازی در این مطالعه ابتدا به میزان ۱۸۰ لاندا از محیط کشت حاوی انگل به چاهک شماره ۱ اضافه شد و به چاهک شماره ۲ تا ۴، ۱۰۰ لاندا محیط کشت حاوی انگل اضافه شد و سپس به میزان ۲۰ لاندا از محلول اسانس اژنول به چاهک اول اضافه شد و بعد از مخلوط شدن ۱۰۰ لاندا از چاهک ۱ به چاهک شماره ۲ اضافه شد و ۱۰۰ لاندا از چاهک شماره ۲ به چاهک شماره ۳ اضافه شد و کار تا چاهک شماره ۴ ادامه پیدا کرد و در انتها ۱۰۰ لاندا از چاهک شماره ۴ دور ریخته شد و این مراحل ۳ بار تکرار شد. به این ترتیب غلظت اسانس اژنول در چاهک‌های ۱ تا ۴ به صورت ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید و سپس در زمان‌های ۶ ساعت، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تعداد انگل مرده، زنده به روش لام نونبار شمارش شد برای اندازه‌گیری درصد مرگ و میر انگل میزان ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت انگل روی لام نونبار ریخته شده و با ۲۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو مخلوط شد و سپس ظرف مدت

دو دقیقه زیر میکروسکوپ تعداد انگل‌های مرده که رنگ گرفته‌اند شمارش شد و در نهایت درصد مرگ و میر و زنده‌مانی انگل اندازه‌گیری شد. یکی از چاهک‌ها هم برای گروه کنترل در نظر گرفته شد و در این چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی انگل اضافه شد و درمان روی آن صورت نپذیرفت در نهایت حداقل غلظتی که سبب مرگ و میر کامل انگل تریکوموناس گالینه شد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس اژنول در نظر گرفته شد.

مطالعات برون تنی: در روش تجربی با رعایت شرایط

رفاه حال پرنده، تعداد ۶۰ کبوتر عاری از آلودگی با تریکوموناس گالینه انتخاب شد و سپس با محیط کشت که در هر میلی‌لیتر حاوی 4×10^4 تروفوزوایت انگل بود از طریق خوراکی آلوده شدند. یک هفته پس از آلودگی تجربی ۳۰ کبوتر در ۳ گروه تحت بررسی اسمیر مرطوب قرار گرفتند و پس از تأیید آلودگی با انگل تریکوموناس گالینه، کبوتران تحت درمان با اسانس اژنول با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزی یک‌بار و تا ۵ روز به‌صورت خوراکی و تک‌تک کبوتران تحت درمان قرار گرفتند و در گروه شاهد هم ۳۰ کبوتر در ۳ گروه بدون درمان مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان زنده‌مانی و میزان مرگ و میر انگل هر روز پس از درمان با استفاده از روش آزمایشگاهی و با استفاده از لام نونبار و تریپان بلو محاسبه شد.

در این مطالعه در ساعت‌های مختلف ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۴ ساعت، ۶ ساعت، ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت از کبوترهای تحت درمان با رعایت شرایط رفاه حال حیوانات و با سرنگ انسولین و از رگ بال یک سی‌سی خون گرفته شد و پس از جداسازی پلاسما در دمای 20°C فریز شد و سپس در آزمایشگاه میزان اسانس اژنول در خون با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. در نهایت همه پرندگان با رعایت رفاه حال حیوانات به‌طور کامل درمان و به محیط پرورش بازگردانده شدند.

در روش HPLC نمونه اسانس اژنول به نسبت ۱:۱۰ با

تری‌کوموناس گالینه اسانس اژنول در جدول شماره یک نمایش داده شده است. نتایج ما کارایی بالای اسانس اژنول در مقابل انگل تری‌کوموناس گالینه را نشان می‌دهد. در گروه تیمار شده با اسانس اژنول ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴۸ ساعت پس از درمان، هیچ انگل تری‌کوموناس گالینه زنده‌ای مشاهده نشد. حداقل غلظت کشندگی (MIC) در ۴۸ ساعت برای اسانس اژنول دوز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد درصد ممانعت از رشد انگل تری‌کوموناس گالینه در تیمار اسانس اژنول در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارند و با گذشت زمان و افزایش دوز اسانس اژنول خاصیت کشندگی انگل افزایش می‌یابد.

متانول حل شد. در این روش متانول به‌عنوان فاز متحرک برای آنالیز HPLC در نظر گرفته شد. و در این روش چون متانول به‌عنوان فاز متحرک غلظت ثابتی داشته است و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه به چاهک‌های دستگاه گروماتوگراف در شرایط دمایی اتاق تزریق شد. میزان اسانس اژنول در زمان‌های مختلف در پلاسما اندازه‌گیری شد.

روش های آماری: آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۶ استفاده شد و از برنامه آنالیز واریانس (ANOVA) برای اندازه‌گیری تفاوت‌های گروه‌های مختلف استفاده شد. زمانی تفاوت معنی‌دار است که $P \leq 0.05$ باشد.

نتایج

شرایط آزمایشگاهی: نتایج خاصیت ضد

جدول ۱- درصد مرگ و میر انگل تری‌کوموناس گالینه در گروه تیمار شده با اسانس اژنول در زمان‌های مختلف

درصد مرگ و میر انگل تری‌کوموناس گالینه					
گروه های اژنول (میکروگرم بر میلی لیتر)				گروه کنترل	زمان (ساعت)
۱۰	۵	۲٫۵	۱٫۲۵		
$58/8 \pm 1/3^e$	51 ± 4^f	$41/6 \pm 3^h$	20 ± 3^k	. ^۱	۶
$60 \pm 3/8^e$	$70/3 \pm 1/2^d$	$47/6 \pm 5/8^g$	$31/5 \pm 2/4^j$. ^۱	۱۲
88 ± 3^b	$71/6 \pm 1/2^d$	53 ± 3^f	$35/8 \pm 2/3^i$. ^۱	۲۴
100^a	$79 \pm 1/5^c$	$56/6 \pm 4/6^e$	$36 \pm 1/3^l$. ^۱	۴۸

در روز دوم، سوم و چهارم پس از درمان کبوتران آلوده با اسانس اژنول کاهش معنی‌داری را در تعداد ترفوزایت انگل تری‌کوموناس گالینه در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$). در روز پنجم پس از درمان هیچ‌گونه ترفوزایت زنده انگل تری‌کوموناس گالینه در چینه‌دان کبوترهای آلوده که با اسانس اژنول درمان شدند، مشاهده نشد.

در طی انجام مطالعه در گروه‌های مختلف مورد مطالعه تلفاتی در بین کبوتران آلوده مشاهده نشد و هیچ‌گونه عارضه جانبی برای گروه کبوترانی که با اسانس اژنول تحت درمان قرار گرفته بودند مشاهده نشد. پس از

شرایط تجربی: مطالعات تجربی کارایی اسانس اژنول در دوز ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم را در کبوتران آلوده نشان می‌دهد (جدول شماره ۲). قبل شروع درمان (روز صفر) تعداد ترفوزایت انگل تری‌کوموناس گالینه که از چینه‌دان کبوترها به دست آمده بود تفاوت معنی‌داری را بین گروه شاهد و تیمار شده با اسانس اژنول نشان نداد.

در روز اول پس از درمان با اسانس اژنول با دوز ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن پرنده سبب کاهش معنی‌دار ترفوزوایت انگل تری‌کوموناس گالینه در مقایسه با گروه کنترل که هیچ‌گونه درمانی صورت نگرفت، شد ($P < 0.05$).

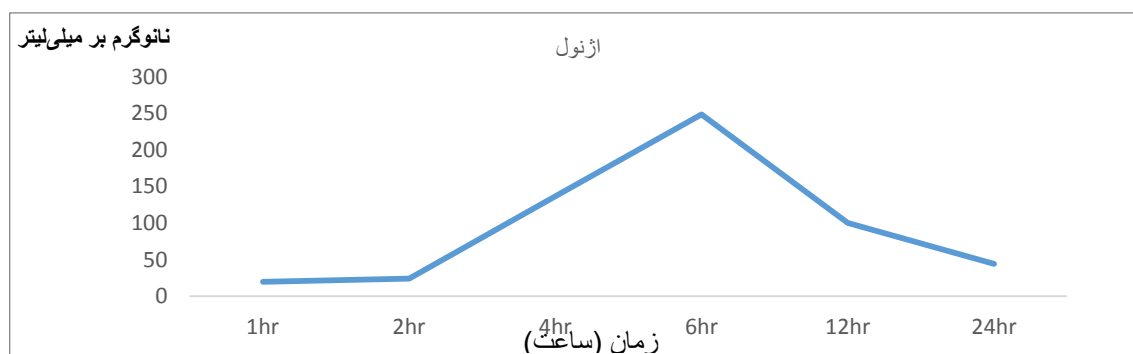
درمان کبوترهای آلوده با تک‌یاخته تریکوموناس گالینه با اسانس اژنول علائم بالینی درگیری با این انگل در این پرندگان به‌طور کامل بهبود یافته بود.

جدول ۲- تعداد ترفوزایت انگل تریکوموناس گالینه در گروه‌های کبوترهای تحت درمان با اسانس اژنول در زمان‌های مختلف

تعداد ترفوزایت $\times 10^4$		
زمان (روز)	گروه کنترل	گروه اژنول (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
۰	۱۱۰/۸۳±۲/۲	۱۱۲/۶۶±۴/۶ ^a
۱	۱۱۸/۳±۴/۶ ^a	۲۲±۱/۵ ^c
۲	۱۱۵±۱/۳ ^a	۱۳/۳۳±۰/۵ ^c
۳	۱۰۹/۱۶±۵ ^a	۲/۳±۰/۳ ^c
۴	۱۱۱/۶۶±۱,۶ ^a	^b
۵	۱۱۵ ^a	^b

علاوه بر این نتایج HPLC نشان می‌دهد مقدار اسانس اژنول در سرم خون پرنده، دو ساعت پس از شروع درمان شروع به افزایش می‌نماید و ۶ ساعت پس از شروع درمان به بیشترین میزان خود می‌رسد و ۲۴ ساعت پس از شروع درمان میزان اسانس اژنول به کمترین میزان خود در سرم خون پرنده می‌رسد (شکل ۱).

علاوه بر این نتایج HPLC نشان می‌دهد مقدار اسانس اژنول در سرم خون پرنده، دو ساعت پس از شروع درمان شروع به افزایش می‌نماید و ۶ ساعت پس از شروع درمان به بیشترین میزان خود می‌رسد و ۲۴ ساعت پس از شروع درمان میزان اسانس اژنول به کمترین میزان خود در سرم خون پرنده می‌رسد (شکل ۱).



شکل ۱- مقدار اسانس اژنول در سرم خون پرنده در ساعت، ۱، ۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از درمان

سال پیش نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی انسان‌ها داشته‌اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (۳۳). امروزه فراورده‌های گیاهی به‌دلیل دسترسی آسان، راحتی کاربرد و اثرات جانبی کمتر در مقایسه با فراورده‌های شیمیایی برای درمان اکثر بیماری‌های انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۲). به همین علت از عصاره، اسانس گیاه و ترکیبات گیاه برای مقابله با انگل تریکوموناس گالینه استفاده می‌شود. مطالعات Adebajo و همکاران در سال ۲۰۰۹، خاصیت ضد انگل تریکوموناس

بحث و نتیجه‌گیری

تریکومونیازیس یکی از بیماری‌های مهم در بسیاری از گونه‌های پرندگان می‌باشد. داروی نیتروایمیدازول همانند مترونیدازول، رونیدازول، کارنیدازول و دیمیتیدازول به‌عنوان داروهایی مهم برای مقابله با ترفوزایت انگل تریکوموناس گالینه محسوب می‌شوند (۱۰). درمان‌های پیشگیرانه با نیتروایمیدازول‌ها برای درمان تریکوموناس گالینه سبب ایجاد جدایه‌های تریکوموناس گالینه مقاوم به نیتروایمیدازول شده است و جدایه‌های انگل تریکوموناس گالینه مقاوم به نیتروایمیدازول در قسمت‌های مختلف جهان گزارش شده است (۱۲، ۲۹، ۳۸). گیاهان از هزاران

گالینه عصاره گیاه *Clausena lansium* را مشاهده نمودند اما عصاره این گیاه در مقایسه با مترونیدازول نمی‌تواند به‌طور کامل انگل *تریکوموناس گالینه* را از بین ببرد (۲). علاوه بر این، این محقق نشان داد آکالوئیدهای کاربازول مشتق شده از گیاه *Murrayakoenigii* و نیشکر خاصیت ضد *تریکوموناسی* دارند ولی در مقایسه با مترونیدازول کارایی پایین‌تری دارا می‌باشند (۱) و همچنین مطالعات *seddik* و همکاران هم نشان می‌دهد گیاه سیر هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط تجربی برای مقابله با انگل *تریکوموناس* قابل مقایسه با داروی مترونیدازول می‌باشد و سبب کاهش رشد ترفوزوایت انگل *تریکوموناس گالینه* می‌شود (۳۳). مطالعات این محققان نشان می‌دهد استفاده از سیر به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به مدت چهار روز متوالی می‌تواند سبب درمان کیوتر آلوده به *تریکوموناس گالینه* گردد.

علی‌رغم مطالعات زیادی که روی عصاره و اسانس گیاهی به‌عنوان خاصیت ضد *تریکوموناسی* انجام شده است با این حال محصولات گیاهی که دارای خاصیت ضد انگل *تریکوموناس* می‌باشند، نفوذ ناچیزی در بازار دارند که می‌تواند به‌علت تغییر در ترکیبات شیمیایی این محصولات، به‌علت زمانی است که گیاه برداشت می‌شود و یا منطقه جغرافیایی است که گیاه برداشت می‌شود و همین امر سبب تغییر در ترکیبات شیمیایی عصاره و یا اسانس گیاه می‌شود (۱۵). برای حل این مشکل، جداسازی ترکیبات زیستی فعال گیاه برای دستیابی به ترکیب ضد *تریکوموناسی* جدید استفاده می‌شود و رویکرد مناسبی برای مقابله با انگل *تریکوموناس گالینه* می‌باشد. در همین زمینه، در مطالعه اخیر به بررسی خواص ضد *تریکوموناس گالینه* اسانس اژنول پرداخته شده است. در مطالعه حاضر مشخص شد اسانس اژنول روی انگل *تریکوموناس* موثر است و با گذشت زمان خاصیت ضد *تریکوموناسی* این ترکیبات افزایش می‌یابد. در این مطالعه اثرات اسانس اژنول در غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی انگل *تریکوموناس گالینه*

تجویز شد و با گروه کنترل که درمانی روی آن صورت نپذیرفت، مقایسه شد. دوزهای پایین اسانس اژنول با گذشت زمان اثرات کشندگی مناسبی روی انگل *تریکوموناس گالینه* ندارد. با این حال غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس اژنول بعد از گذشت ۴۸ ساعت سبب مرگ کامل ترفوزوایت انگل *تریکوموناس گالینه* شد. اسانس اژنول اثرات مؤثری روی این انگل دارد و می‌تواند به‌عنوان روش جایگزین برای سویه‌های مقاوم به مترونیدازول استفاده شود.

مکانیسم ضد انگلی، ضد تک‌یاخته‌ای، ضد کنه، ضد جرب و حشره‌کشی این ترکیب به این دلیل می‌باشد که این ترکیب جزو ترکیبات فنوله و معطر طبیعی می‌باشد و با اتصال به آنزیم NADH دهیدروژناز، فعالیت اکسیداسیون و فسفریلاسیون کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندری را مختل می‌نماید و در نتیجه سبب مرگ انگل می‌شود (۴۰). علاوه بر این، این اسانس دارای خواص شیمی درمانی مناسب برای مقابله با سرطان، ضد التهاب، ضد فیبروتیک، آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی می‌باشد (۲۷، ۲۵، ۳۹، ۶).

در همین راستا مطالعات یوسفی و همکاران نشان داد اسانس درمنه دشتی سبب بهبودی کبوتران آلوده با انگل *تریکوموناس گالینه* می‌شود علاوه بر این نتایج این مطالعه نشان داد اسانس درمنه دشتی در مقایسه با مترونیدازول کارایی بالاتری برای مقابله با این انگل دارا می‌باشد. اسانس اژنول یکی از مهم‌ترین و بالاترین ترکیبات اسانس گیاه درمنه دشتی می‌باشد و احتمالاً خاصیت ضد *تریکوموناسی* اسانس درمنه دشتی را به این ترکیب نسبت می‌دهند (۳۸) و نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر شباهت دارد. مطالعات دیگری هم فعالیت ضد *تریکوموناس گالینه*، اسانس گیاه *Dennettia tripetala* را نشان می‌دهد و مطالعات این محققان نشان می‌دهد اسانس اژنول یکی از مهم‌ترین ترکیبات اصلی این گیاه می‌باشد که همانند مطالعه حاضر خواص ضد *تریکوموناس* این گیاه را به این ترکیب نسبت می‌دهند (۱۱) علاوه بر این مطالعات تبری

و همکاران در سال ۲۰۱۷ خواص ضد تریکوموناس گالینه، آلکالوئید گیاه اسپند را منتشر نمودند، این محققان به این نتیجه رسیدند که ترکیبات هارمین و هارمالین دو ترکیب آلکالوئیدی اصلی در گیاه اسپند می‌باشند که دارای خواص ضد تریکوموناسی همانند اسانس اژنول می‌باشد و به‌عنوان ترکیب طبیعی برای مقابله با تریکوموناس

استفاده می‌شود (۳۶).

پیشنهادات

پیشنهاد می‌شود مطالعات سم‌شناسی و همچنین بررسی پاتولوژیک بافت کبد و کلیه پرندگان مورد آزمایش با اسانس اژنول، جهت بررسی اثرات نامطلوب و عوارض جانبی احتمالی این ترکیب صورت پذیرد.

References

- 1- Adebajo AC, Ayoola OF, Iwalewa EO, Akindahunsi AA, Omisore NO, Adewunmi CO, et al. Anti-trichomonal, biochemical and toxicological activities of methanolic extract and some carbazole alkaloids isolated from the leaves of *Murraya koenigii* growing in Nigeria. *Phytomedicine*. 2006; 13: 246-254.
- 2- Adebajo AC, Iwalewa EO, Obuotor EM, Ibikunle GF, Omisore NO, Adewunmi CO, et al. Pharmacological properties of the extract and some isolated compounds of *Clausena lansium* stem bark: anti-trichomonal, antidiabetic, anti-inflammatory, hepato-protective and antioxidant effects. *Ethnopharmacol*. 2009; 122: 10-19.
- 3- Asha MK, Prashanth D, Murali B, Padmaja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitot-erapia*. 2001; 72: 669-670.
- 4- Aydın L, Coşkun Ş. Efficacy of carnidazole (Spatrix®) and metronidazole (Flagyl®) against *Trichomonas gallinae* in naturally infected pigeons. *Acta Parasitol Turcica*. 2000; 24(1): 65-66.
- 5- Boal CW, Mannan RW, Hudelson KS. Trichomoniasis in Cooper's hawks from Arizona. *J. Wildlife Dis*. 1998; 34: 590-593.
- 6- Batiha GE, Alkazmi LM, Wasef G, Beshbishy AM, Nadwa EH, Rashwan EK. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules*. 2020; 10: 202.
- 7- El-kady AM, Ahmad AA, Hassan TM. Eugenol, a potential schistosomicidal agent with anti-inflammatory and antifibrotic effects against *Schistosoma mansoni*, induced liver pathology. *Infect Drug Resist*. 2019; 12: 709-719.
- 8- El-Sayed EMA. Some studies on trichomoniasis in pigeons in Sharkia province. M.V.Sc. Thesis, Zagazig Univ, Dept. of Avian and Rabbit Diseases, *Egypt*. 2005.
- 9- El-Zemity SR, Rezk HA, Farok S, Zaitoon AA. Acaricidal activity of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Trends in acarology*. 2010; 541-543.
- 10- Franssen FFJ, Lumeij JT. In vitro nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *J Vet Pharmacol Ther*. 1992; 15(4): 409-415.
- 11- Gbolade AA, Arcoraci T, D'Arrigo M, Olorunmola FO, Biondi DM, Ruberto G. Essential oils of *Dennettia tripetala* Bak. f. stem bark and leaf. Constituents and biological activities. *Planta Medica*. 2009; 75: .PI32.
- 12- Gerhold RW, Yabsley MJ, Smith AJ, Ostergaard E, Mannan W, Cann JD, et al. Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae* morphologic complex in the United States. *J. Parasitol*. 2008; 94: 1335-1341.
- 13- He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of Eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 163, 137-143.. Protozoan and helminthes parasites endorsed by imported camels (*Camel dromedaries*) to Egypt. *J. Parasit. Dis*. 2007; 43.
- 14- Helmy NA. Biological studies on trichomoniasis in birds. M.V.Sc.Thesis, (Parasitology Dept.) Fac. of Vet Med Zagazig Univ. *Egypt*. 1995.
- 15- Khalid KA, Essa EF, Ismaiel HM, Elsayed AA. Effects of geographical locations on essential oil composition of navel orange leaves and flowers. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2020; 23: 139-148.
- 16- Khater HF. Ecosmart biorational insecticides: alternative insect control strategies. In:

- Perveen F (ed) Advances in integrated pest management. *InTech Croatia*. 2011; 17–60.
- 17- Khater HF.** Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. *Pharmacologia*. 2012; 3(12): 641–656.
- 18- Khater HF.** Bioactivity of essential oils as green biopesticides: recent global scenario. In: Govil JN, Bhattacharya S (eds) Recent progress in medicinal plants, vol. 37. Essentials oils II. Studium Press LLC, USA. 2013.
- 19- Khater HF, Ramadan MY, El-Madawy RS.** Lousicidal, ovicidal, and repellent efficacy of some essential oils against lice and flies infesting water buffaloes in Egypt. *Vet Parasitol*. 2009; 164: 257–266.
- 20- Khater HF, Hanafy A, Abdel-Mageed AD, Ramadan MY, El-Madawy RS .** Control of the myiasis producing fly, *Lucilia sericata*, with Egyptian essential oils. *Int J Dermatol*. 2011; 50(2): 187–194.
- 21- Khater HF, Ramadan MY, Abdel Mageid AD.** In vitro control of the camel nasal botfly, *Cephalopina titillator*, with doramectin, lavender, camphor, and onion oils. *Parasitol Res*. 2013; 112: 2503–2510.
- 22- Khater HF, Seddiek SA, El-Shorbagy MM, Ali MM.** The acaricidal efficacy of peracetic acid and deltamethrin against the fowl tick, *Argas persicus*, infesting laying hens. *Parasitol Res*. 2013; 112(1): 259–269.
- 23- Lumeij JT, Zwijnenberg RJ.** Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). *Avian. Pathol* . 1990; 19: 165-166.
- 24- Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Custodio JBA, Cavaleiro C, Sousa MC.** Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Expt Parasitol*. 2011; 127: 732-739.
- 25- Mahapatra SK, Roy S.** Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and ocimum gratissimum linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014; 7(1): 391-397.
- 26- Nejad SM, Özgüneş H, Başaran N.** Pharmacological and toxicological properties of Eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*. 14, 201.
- 27- Raja MRC, Srinivasan V, Selvaraj S, Mahapatra SK.** Versatile and synergistic potential of eugenol: A review. *Pharm. Anal. Acta*. 2017; 6:1–6.
- 28- Robinson RA, Lawson B, Toms MP, Peck KM, Kirkwood JK, Chantrey J, et al.** Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. *PLoS One*. 2010; 5: 12215.
- 29- Rouffaer LO, Adriaensen C, De Boeck, C, Claerebout E, Martel A.** Racing pigeons: a reservoir for nitro-imidazole-resistant *Trichomonas gallinae*. *Parasitol*. 2014; 100: 360-363.
- 30- Sansano-Maestre J, Garijo-Toledo MM, Gómez-Muñoz MT.** Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. *Avian Pathol*. 2009; 38: 201-207.
- 31- Seddiek SA, Ali MM, Khater HF, El-Shorbagy MM.** Anthelmintic activity of the white wormwood, *Artemisia herba-alba* against *Heterakis gallinarum* infecting turkey poults. *J Med Plants Res*. 2011; 5(16): 3946–3957.
- 32- Seddiek SA, Khater HF, El-Shorbagy MM, Ali MMA.** The acaricidal efficacy of aqueous neem extract and ivermectin against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* in experimentally infested rabbits. *Parasitol Res*. 2013; 112: 2319–2330.
- 33- Seddiek A, El-Shorbagy MM, Khater HF, Ali AM.** The antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae* infecting domestic pigeons. *Parasitol Res*. 2014; 113: 1319-29.
- 34- Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P.** Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis: an emerging problem. *N Engl J Med*. 1999; 341: 292–295.
- 35- Stockdale JE, Dunn JC, Goodman SJ, Morris AJ, Sheehan DK, Grice PV, et al.** The protozoan parasite *Trichomonas gallinae* causes adult and nestling mortality in a declining population of European Turtle Doves. *Streptopelia turtur*. *Parasitology*. 2015; 142: 490-498.
- 36- Tabari MA, Youssefi MR, Esfandiari A, Benelli G.** Toxicity of β -citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Res Vet Sci*. 2017; 114: 36-40. [In Persian]
- 37- Tabari MA, Youssefi MR, Moghadamnia AA.** Antitrichomonal activity of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in pigeon (*Columba livia domestica*). *British Poultry Science*. 2017; 58: 236-241.

38- Youssefi MR, Tabari MA, Moghadamnia AA. In vitro and in vivo activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2017; 18: 25-29. [In Persian]

39- Xie Y, Yang Z, Cao D, Rong F, Ding H, Zhang D. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). *Ind Crops Prod*. 2015; 77: 780–786.

40- Shang Xf, Dai LX, Yang CJ, Guo X, liu YQ, Miao XL, Zhang JY. A value-added application of eugenol as acaricidal agent: The mechanism of action and the safety evaluation. *Journal of Advanced Research*. 2021; 34: 149-158.

41- Azeredo CM, Soares MJ. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23(5): 762-768.

42- Fazeli-Nasab B, Rahnama M, Mazarei A. Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2017; 27(149): 63-78. [In Persian]

43- de Almeida I, Alviano DS, Vieira DP, Alves PB, Blank AF, Lopes AH, et al. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol. Res*. 2007; 101: 443–452.



In vitro and in vivo activity of Eugenol against *Trichomonas gallinae*

Abdollah Khaki¹, Mohammadreza Youssefi^{2*}, Nadia Taiefi Nasrabadi¹

1- Department of Veterinary Parasitology, karaj Branch, Islamic Azad University, karaj, Iran.

2- Department of Veterinary Parasitology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Receive: November 17, 2023; Revise: December 16, 2023; Accept: December 26, 2023

 10.22034/nfvm.2024.425486.1212

Summary

This study sought to explore the in vitro and in vivo efficacy of eugenol, the principal compound in the clove plant, against *Trichomonas gallinae* (*T. gallinae*). In the in vitro investigation, Diamond's modified culture medium was employed. The parasite sample was derived from an infected pigeon, cultured, and then maintained in an incubator at 37 °C for 48 hours until the protozoa count reached approximately 1×10^4 parasites per ml of culture medium. Subsequently, two groups were assigned: Group one received no treatment, while group two was treated with eugenol. Ninety-six plates were utilized, and the culture medium containing the parasite and eugenol was added to these plates. Doses of 10, 5, 2.5, and 1.25 µg/ml of eugenol were administered. The number of dead and alive parasites, along with the percentage of parasite mortality, was measured at intervals of 6, 12, 24, and 48 hours post-mixing. For the in vivo experiment, 60 pigeons were experimentally infected with *T. gallinae* and divided into two groups. Group one served as the control, receiving no treatment, while group two was treated with eugenol at a dose of 10 mg/kg for five consecutive days. Results from the in vitro study demonstrated that a concentration of 10 µg/ml of eugenol resulted in 100% lethality in *T. gallinae* after 48 hours. The in vivo study indicated that eugenol at a dose of 10 mg/kg led to 100% recovery five days post-treatment. These findings underscore the effectiveness of eugenol against the *T. gallinae* parasite, suggesting its potential as an alternative treatment.

Keywords: *Trichomonas*, *Eugenol*, *Pigeon*