Journal of Microbial World
Volume 16, No. 2, September 2023

Original Article

Comparing the effect of metronidazole with pyocyanin pigment extracted from *Pseudomonas aeruginosa* on *Trichomonas vaginalis* in-vitro

Sara Abdizadeh jozam[1], Zohreh Momeni[2], Mona Farhadi[2]

[1]MSc, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
[2]Assistant Proffessor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Pyocyanin is a blue pigment with oxidation and reduction potential and metabolically active, which has medicinal effects on eukaryotic and prokaryotic cells. *Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomoniasis, the most important non-viral sexually transmitted disease in the world. The aim of this study was to evaluate the effect of pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa* on *Trichomonas vaginalis* and PC12cell line.

Materials & Methods: This study was carried out by an interventional method. First, pyocyanin was extracted from *Pseudomonas aeruginosa* strain RTCC1474 with the help of chloroform. The relative purity of the pigment was determined by thin-layer chromatography, spectrophotometry UV-Vis and FTIR. Its effect in different concentrations were investigated on *Trichomonas vaginalis* and PC12 cell line.

Results: Pyocyanin at a concentration of 10,000µg/ml in 24 hours and concentrations of 5,000 and 2,500µg/ml in 48 hours caused 100% inhibition of the parasite growth. Its IC50 (Inhibitory Concentration of 50%) level in 48 hours was 17.44µg/ml and the CC50 of this pigment on the cell line was 930 µg/ml, so pyocyanin is effective against the *Trichomonas vaginalis* and its toxicity on the cell line is 53 times higher than of the parasite (SI=53/32).

Conclusion: Considering the inhibitory effect of pyocyanin on the growth of Trichomonas vaginalis based on the results, it is possible that with further research on the extraction and purification of this pigment from various isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, and with additional tests in vitro and in vivo, a more accurate judgment regarding the antiparasitic power of this pigment can be expressed.

Keywords: Pyocyanin pigment, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichomonas vaginalis*, Cell line, metronidazole.

Received: 4 April 2023 Revised: 12 June 2023 Accepted: 20 August 2023

Correspondence to: Zohreh Momeni
Tel: +98 9123661202
E-mail: zohreh.momeni@kiau.ac.ir
Journal of Microbial World 2023, 16(2): 89 - 101
DOI:10.30495/jmw.2023.1962624.2025

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره دوم (پیاپی ۵۵) تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۱۰۱-۸۹

Original Article

مقایسه تاثیر مترونیدازول با پیوسیانین سودوموناس آئروژینوزا بر روی تریکوموناس واژینالیس در شرایط برون‌تنی

سارا عبدی‌زاده جوزم[۱]، زهره مومنی[۲*]، مونا فرهادی[۲]

[۱]کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. [۲]استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: رنگدانه پیوسیانین ترکیبی با پتانسیل اکسایش و احیا، آبی‌رنگ و از نظر متابولیکی فعال می‌باشد و اثرات دارویی بر سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی دارد. تریکوموناس واژینالیس عامل ایجادکننده تریکومونیازیس، مهم‌ترین بیماری غیرویروسی مقاربتی در جهان است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر رنگدانه پیوسیانین استخراج شده از باکتری سودوموناس آئروژینوزا برروی انگل تریکوموناس واژینالیس و رده سلولی PC12 بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به روش مداخله‌ای تجربی انجام شد. ابتدا رنگدانه پیوسیانین به کمک کلروفرم از سویه سودوموناس آئروژینوزا RTCC1474 استخراج و خلوص نسبی رنگدانه با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک، اسپکتروفتومتری UV-Vis و FTIR تایید شد. سپس تاثیر غلظت‌های مختلف آن روی تریکوموناس واژینالیس و رده سلولی PC12 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: رنگدانه پیوسیانین در غلظت ۱۰۰۰۰ µg/ml در ۲۴ ساعت و غلظت‌های ۵۰۰۰ µg/ml و ۲۵۰۰ در ۴۸ ساعت باعث مهار صددرصد رشد انگل شد. میزان IC50 آن در ۴۸ ساعت ۱۷/۴۴µg/ml بوده و نیز CC50 این رنگدانه بر روی رده سلولی ۹۳۰µg/ml به‌دست آمد، بنابراین پیوسیانین برروی انگل تریکوموناس واژینالیس موثر بوده و سمیت آن بر روی رده سلولی نسبت به انگل با غلظت ۵۳ برابر است (SI = ۳۲/۵۳).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر بازدارندگی رنگدانه پیوسیانین بر رشد تریکوموناس واژینالیس براساس نتایج حاضر، می‌توان با تحقیقات بیشتر روی استخراج و خالص‌سازی رنگدانه پیوسیانین از انواع جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا و نیز با آزمایشات تکمیلی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی، قضاوت دقیق‌تری در رابطه با توان ضدانگلی این رنگدانه به‌دست آورد.

کلمات کلیدی: رنگدانه پیوسیانین، سودوموناس آئروژینوزا، تریکوموناس واژینالیس، رده سلولی، مترونیدازول.

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱/۱۵ ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۳/۲۲ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۲۹

مقدمه

تریکومونیازیس شایع‌ترین بیماری غیرویروسی مقاربتی در جهان می‌باشد که توسط انگل *تریکوموناس واژینالیس* (*Trichomonas vaginalis*) ایجاد می‌شود، این انگل دستگاه ادراری تناسلی زنان و مردان را آلوده می‌کند. در زنان، واژن و در مردان، مجرای ادراری شایع‌ترین محل عفونت می‌باشد. بسیاری از زنان آلوده بدون علامت بوده و علائم بالینی شامل سوزش ادرار، ترشحات واژن بدبو، زرد، سبز و کف آلود است، اکثر مردان آلوده بدون علامت می‌باشند (۱). به طور سنتی تصور می‌شود که عفونت در مردان خوش خیم است، با این

* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۳۶۶۱۲۰۲ پست الکترونیک: zohreh.momeni@kiau.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

حال، *تریکوموناس واژینالیس* با اورتریت غیر گونوکوکی پروستاتیت و اختلال در عملکرد اسپرم همراه است (۲) داروی مترونیدازول در درمان تریکومونیازیس به کار می‌رود، اما مقاومت به این دارو مشاهده شده و در حال افزایش است (۱).

طبیعت دارای رنگ‌های زیستی بسیاری است. رنگدانه‌های طبیعی از مدت‌ها قبل مورد استفاده قرار گرفته‌اند و اعتقاد بر این است که به دلیل ماهیت غیرسمی، غیر سرطان‌زا و زیست تخریب‌پذیری، ایمن هستند. رنگدانه طبیعی می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد جایگزین رنگ‌های مصنوعی برای کاهش اثرات مضر آن‌ها استفاده شود. منابع اصلی رنگدانه‌ها در طبیعت گیاهان و میکروارگانیسم‌ها هستند. با این حال، رنگدانه‌های به‌دست‌آمده از میکروارگانیسم‌ها به دلیل پایداری و در دسترس بودن میکروارگانیسم‌ها برای کشت در طول سال، بر رنگ‌های گیاهی ترجیح داده می‌شوند. میکروارگانیسم‌ها رنگدانه‌های مختلفی مانند کینون‌ها، کاروتنوئیدها، ویولاسین، نیل و ملانین‌ها را تولید می‌کنند که می‌توانند به‌عنوان رنگ‌کننده طبیعی برای رفاه انسان و حفظ محیط زیست مورد استفاده قرار گیرند. میکروارگانیسم‌هایی مانند جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها به خوبی برای سنتز رنگدانه شناخته شده‌اند. دلایل مختلفی وجود دارد که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند رنگدانه‌ها را سنتز کنند. فتوسنتز، محافظت در برابر اشعه ماوراء بنفش، مکانیسم‌های دفاعی، متابولیت‌های ثانویه برای ذخیره انرژی و غیره. در بین میکروارگانیسم‌های مختلف، گونه‌های باکتریایی مانند *سودوموناس*، *ویبریو*، *استرپتومایسس*، *باسیلوس*، *سیتوفاگا*، *سودوآلتروموناس* و غیره نمونه‌های شناخته شده‌ای برای تولید رنگدانه هستند (۳)

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) باکتری میله‌ای شکل هوازی گرم منفی به اندازه ۰/۸-۰/۵ میکرومتر عرض و ۳/۰-۱/۵ میکرومتر طول بوده که در فضاهای کم اکسیژن رشد کرده و زیستگاه گسترده‌ای دارد. این باکتری در محیط‌های خاک، آب، فضای بیمارستان و گیاهان و فاضلاب یافت می‌شود و با توجه به این‌که فرصت‌طلب است قادر به ایجاد عفونت دستگاه تنفسی و ادراری در افراد با نقص ایمنی است. *سودوموناس آئروژینوزا* با توجه به توانایی تولید رنگدانه‌های خارجی، یک میکروب با ارزش از لحاظ تجاری بوده، این رنگدانه‌ها طیف گسترده‌ای ازکاربردهای صنعتی، غذایی، دارویی و همچنین منسوجات دارند و شامل پیوسیانین (سبزآبی)، پیوملانین (قهوه‌ای روشن)، پیووردین (زردسبز فلورسنت) و پیوروبین (قهوه‌ای قرمز) می‌باشد. ۹۰ تا ۹۵ درصد از جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* پیوسیانینِ محلول در آب تولید می‌کنند که نه تنها عامل حدت باکتری است بلکه به دلیل اثرات دارویی بر سلول‌های فیتوپاتوژن، پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها به عنوان کنترل‌کننده زیستی شناخته می‌شوند (٤). پیوسیانین یک رنگدانه فنازین آبی‌سبز است که عمدتا از طریق چرخه اکسایش و کاهش و القای گونه‌های اکسیژن فعال باعث آسیب بافتی می‌شود (۵). این رنگدانه محلول در آب، حاوی نیتروژن و مشتق از فنازین خارج سلولی است که یک متابولیت ثانویه تولیدی توسط *سودوموناس آئروژینوزا* است. پیوسیانین فعالیت‌های بیولوژیکی همچون فعالیت ضدسرطانی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و... دارد که با توجه به پتانسیل این رنگدانه در کاربردهای پزشکی، دارویی، غذایی، نساجی، کنترل زیستی و... یک رنگدانه چندمنظوره و همه‌کاره می‌باشد. اگرچه این ترکیب بسیار کاربردی است، اما گران‌قیمت بوده (۵ میلی‌گرم پیوسیانین سیگما آلدریچ) و پیدا کردن یک روش بهینه برای تولید آن در مقیاس بالا با اهمیت است (٦).

مواد و روش‌ها

با توجه به کاربردهای این رنگدانه و اهمیت درمان بیماری تریکومونیازیس به دلیل مقاومت به داروی مترونیدازول، هدف از این تحقیق جداسازی رنگدانه پیوسیانین از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و بررسی اثر آن بر روی انگل *تریکوموناس واژینالیس* می‌باشد.

این مطالعه به روش مداخله‌ای-تجربی به شرح زیر انجام شد:

الف) جداسازی رنگدانه از باکتری سودوموناس آئروژینوزا: نمونه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* با کد RTCC1474 (Razi type culture collection) از موسسه تحقیقات واکسن و

سرم‌سازی رازی خریداری شد. باکتری در محیط نوترینت آگار کشت و به مدت ٤٨ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه، تست‌های بیوشیمیایی برای تایید سویه باکتری انجام و نتایج با رفرنس‌های معتبر مقایسه شد. سپس سویه باکتری، به محیط نوترینت براث (ایبرسکو) انتقال داده شد. برای افزایش تولید رنگدانه به میزان حجم محیط کشت نوترینت براث ۲ درصد گلیسرول (قطران شیمی) افزوده شد (۷). ارلن‌های حاوی کشت باکتری را در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده و پس از گذشت دو الی سه هفته تولید رنگدانه بررسی شد. هر چه محیط کشت باکتری تیره‌تر باشد غلظت رنگدانه بیشتر است. محیط کشت غنی از رنگدانه به رنگ سبز آبی تیره مشاهده شد. این محیط را با دور ١٤٣٤RCF به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی حاوی رنگدانه جدا شد. سپس به نسبت مساوی کلروفرم (نوترون) اضافه و حدود ۵ دقیقه تکان داده شد. لایه محلول آبی جدا و به اندازه ۲۰ درصد حجم آن هیدروژن کلراید (۰/۱ نرمال، دکتر مجللی) اضافه و خوب تکان داده شد تا لایه اسیدی صورتی فوقانی ایجاد شود. تراکم نوری جذب نمونه مورد نظر بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر بررسی شد و از فرمول زیر غلظت رنگدانه به‌دست آمد. (غلظت پیوسیانین = $OD_{520} \times 17.072$)

به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis در طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر محلول رنگدانه در حالت اسیدی (ترکیب با HCL) بررسی و سپس لایه صورتی جدا شد و سدیم هیدروکسید(۰/۱ نرمال، مرک) قطره قطره اضافه شد تا جایی که رنگ آبی بازیابی شود. رنگدانه آبی رنگ با کمک فیلتر سرسرنگی ۰/٤٥ نانومتر فیلتر و داخل پلیت شیشه‌ای ریخته شد. بعد از حدود یک هفته پودر حاصل بوسیله لانست استریل تراشیده، درون میکروتیوپ استریل ریخته، داخل یخچال ۲۰- درجه قرار گرفت تا در مواقع لزوم در آب مقطر استریل حل کردیم (٤).

برای بررسی خلوص رنگدانه و ارزش R_f (Retention Factor) به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) از ورق TLC، حلال کلروفرم و متانول (مرک) به نسبت برابر استفاده شد. به کمک یک لوله مویین مقداری از رنگدانه پیوسیانین برداشته و روی کاغذ TLC قرار داده شد. سپس کاغذ TLC را درون بشر حاوی حلال قرار داده و بر اساس خاصیت مویینگی حلال در کاغذ بالا رفته و رنگدانه را نیز حرکت می‌دهد، چنانچه ماده مورد نظر خالص باشد تنها یک لکه روی کاغذ ظاهر می‌شود، R_f استاندارد پیوسیانین با توجه به مقالات (۰/۸۱– ۰/۷۰) می‌باشد که از فرمول زیر به‌دست آمد (۸).

$$R_f = \frac{a}{b}$$

a= میزان بالا رفتن حل شونده (رنگدانه)، b= میزان بالا رفتن حلال (از خطی که به نقطه رنگدانه می‌رسد.)

خاصیت ردوکس رنگدانه پیوسیانین و دوگانگی در حلالیت آن، تصفیه این رنگدانه را از طریق تغییر pH و استخراج به وسیله‌ی کلروفرم امکان‌پذیر کرده و از آنجایی که فقط پیوسیانین قابلیت تغییر حلالیت با تغییر pH را دارد نتیجه گرفته شده است که بلورهای تشکیل شده در مرحله آخر استخراج از پیوسیانین خالص تشکیل شده است (۹). برای بررسی گروه‌های عاملی و پیوندهای شیمیایی موجود در ترکیب، تجزیه و تحلیل طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) از پودر رنگدانه، بررسی گردید (۸).

ب)کشت انگل تریکوموناس واژینالیس: سوش تریکوموناس واژینالیس تایپ H ژن اکتین با کد ثبت KP400513 از بانک انگلی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تهیه شد (۱۰). کرایو ویال‌های حاوی سوش انگل *تریکوموناس واژینالیس* از فریزر ۷۰- درجه‌ی سلسیوس بیرون آورده و با سرعت به کمک سمپلر در شرایط استریل به محیط کشت کامل TYM (Trypticase yeast extract maltose) انتقال داده شد. این محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله استریل (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی) به همراه آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B (جابرابن حیان)۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سفتریاکسون (پارس نامی دارو) ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و سیپروفلوکساسین (شهیدقاضی)۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۱۱). طی پنج مرحله پاساژ یک روز در میان، کشت انگل انجام شد تا تعداد آن به انبوه چندین میلیونی برسد. برای انجام

تست تاثیر رنگدانه از پلیت‌های استریل ۲۴ خانه‌ای استفاده گردید. حلال پودر پیوسیانین آب می‌باشد (۱۲) . میزان ۰/۴ گرم از پودر رنگدانه را در ۱سی‌سی آب مقطر استریل حل کرده (غلظت ۴۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ نانومتر عبور دادیم. رقت‌های مختلف از رنگدانه از محلول فوق تهیه و در چاهک‌های حاوی کشت انگل *تریکوموناس واژینالیس* ریخته و تاثیر آن بررسی شد. برای بررسی تاثیر رنگدانه پیوسیانین بر انگل *تریکوموناس واژینالیس* در چاهک‌های میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBS (pH ۶/۵) به چاهک‌های آزمایش اضافه، سپس ۳۰۰ میکرولیتر از استوک اولیه رنگدانه پیوسیانین با غلظت ۴۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک اول و دوم اضافه شده و به روش رقت سریالی از چاهک دوم به بعد رنگدانه مورد نظر رقیق‌سازی و از چاهک آخر ۳۰۰ میکرولیتر خارج شد (سری رقتی از رنگدانه پیوسیانین مناسب است که در برخی غلظت‌ها انگل کاملا از بین برود و بعضی غلظت‌ها انگل زنده بماند). سپس به همه‌ی چاهک‌ها میزان ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل TYM افزوده و درنهایت ۱۰۰ میکرولیتر از لوله حاوی انگل که به کمک لام نئوبار شمارش کرده و به ۶۰۰۰۰۰ عدد در میلی‌لیتر تنظیم کرده بودیم را به همه‌ی چاهک‌ها اضافه کردیم. برای کنترل منفی به چاهک به جای رنگدانه، بافر PBS اضافه شد و برای افزایش دقت هر کدام از رقت‌های رنگدانه در ۲ چاهک انجام و آزمایش سه بار تکرار شد. پلیت درانکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان تحرک و زنده بودن انگل‌ها با کمک رنگ تریپان بلو (انگل‌های زنده بی‌رنگ باقی مانده و انگل مرده رنگ را جذب می‌کند) و لام نئوبار بررسی شد. نتایج شمارش انگل به صورت درصد بازدارندگی رشد GI% با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$GI\% = \frac{a-b}{a} \times 100$$

a تعداد انگل زنده در میکروتیوپ شاهد منفی و b تعداد انگل زنده در میکروتیوپ حاوی رنگدانه می‌باشد. همچنین مقدار IC_{50} به کمک نرم افزار GraphPad prism ۹ محاسبه گردید. به منظور بررسی تاثیر داروی مترونیدازول بر انگل، همزمان مراحل قبل تکرار شده و بجای رنگدانه پیوسیانین از داروی مترونیدازول (جابراین حیان) با رقت‌های مختلف استفاده گردید، و در نهایت محاسبات به کمک نرم افزار GraphPad ۹ prism انجام شد.

ج)بررسی میزان سمیت رنگدانه بوسیله‌ی آزمون MTT: از آنجا که دارو یا ترکیبی در درمان تریکومونیازیس مناسب است که علاوه بر اثر ضدانگلی قوی، سمیت سلولی نداشته باشد و به عبارتی شاخص درمانی بالایی داشته باشد، لذا در این پژوهش به منظور بررسی میزان سمیت رنگدانه پیوسیانین آزمون (MTT) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide انجام شد. کیت MTT (شرکت سیب زیست فن) و رده سلولی PC12 از دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شد. سلول‌های PC12 در فلاسک T25 و در محیط کشت DMEM (Bio-idea) غنی شده با ۱۰ درصدFBS (گیبکو) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین–استرپتومایسین (DNAbiotech) کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس حاوی ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه و مطابق دستورالعمل کیت مربوط کشت سلول و تیمار با رنگدانه پیوسیانین انجام شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، محیط رویی پلیت تخلیه و در مرحله تیمار کردن، غلظت‌های مختلف از رنگدانه پیوسیانین و داروی مترونیدازول که از قبل رقت‌سازی شده بود (۲۰۰۰۰،۱۰۰۰۰،۵۰۰۰،۲۵۰۰،۱۲۵۰،۶۲۵،۳۱۲،۱۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیوسیانین) و (۲۰۰،۱۰۰،۵۰،۲۵،۱۲/۵،۶/۲۵،۳/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر مترونیدازول)، به همراه محیط کشت تازه به چاهک‌ها اضافه شد به نحوی که درون چاهک غلظت مورد نظر از رنگدانه به‌دست آمد. پلیت مجددا درون انکوباتور قرار گرفت و پس از گذشت ۴۸ ساعت با اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر ماده MTT غلظت این ترکیب ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر درون چاهک حاصل گردید. سریعا سطح پلیت با فویل پوشانده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرارداده شد. سپس پلیت تخلیه و ۱۰۰

میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه و ۵ دقیقه به خوبی تکان داده شد تا کریستال‌ها در DMSO حل شوند و به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانش انجام شد (۱۳). درنهایت درصد حیات سلولی با کمک نرم افزار GraphPad prism محاسبه گردید.

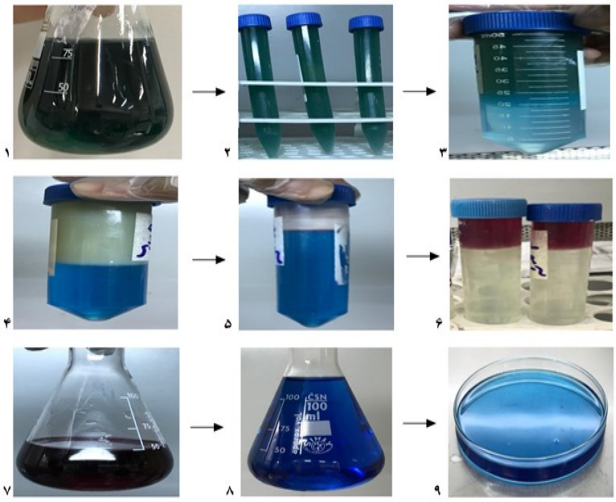
یافته‌ها

نتایج آزمایشات فنوتیپی و بیوشیمیایی، باکتری را تایید نمود. باسیل گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط بلاد آگار بتاهمولیز ایجاد کرد. یکی از قابل تشخیص‌ترین علائم شناسایی کلنی باکتری، بوی میوه‌ای و مشخص انگور می‌باشد که مورد تایید قرارگرفت. انتشار رنگدانه سبزآبی پیوسیانین در محیط کشت و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس نیز تایید شد. این باکتری از لحاظ تست ایندول، Methyl red، Voges Proskauer و H2S منفی و سیترات مثبت بود. درمحیط TSI پاسخ ALK/ALK نشان داد که به دلیل عدم توانایی تخمیر قندها و تولید اسید این باکتری مورد نظر است، نتایج همه‌ی تست‌های ذکر شده مشابه نتایج سویه استاندار بود.

محیط کشت نوترینت براث حاوی گلیسرول، بهترین محیط تولید پیوسیانین در غلظت‌های بالا بود. گلیسرول به‌عنوان منبع کربن برای باکتری می‌باشد و سبب افزایش تولید پیوسیانین در محیط می‌شود (۷). با توجه به تست‌های مختلف در طی استخراج رنگدانه، در همه‌ی مراحل، شاهد ایجاد یک لکه آبی رنگ بر روی ورق TLC بودیم که نشان‌دهنده خلوص عصاره‌ی حاصل بود. ارزش R_f رنگدانه حاصل در زمان‌های مختلف به شکل روبرو بوده که با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۸). (R_f=0/70-0/81)

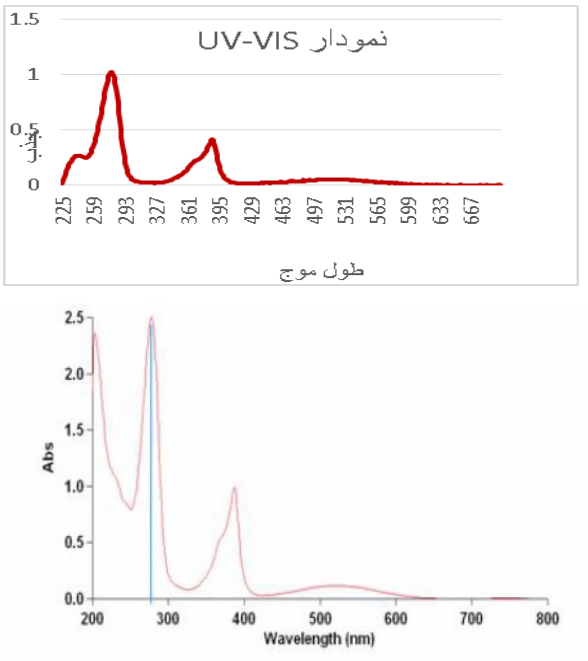
از هر ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث حاوی گلیسرول کشت داده شده با *سودوموناس آئروژینوزا* که پس از گذشت ۲ الی ۳ هفته بسیار پررنگ و سبزآبی بود، تقریبا ۱۶۰ میلی‌گرم پودر پیوسیانین استخراج شد.

جذب رنگدانه پیوسیانین در طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر UV-Vis زمانی که در HCL ترکیب بود



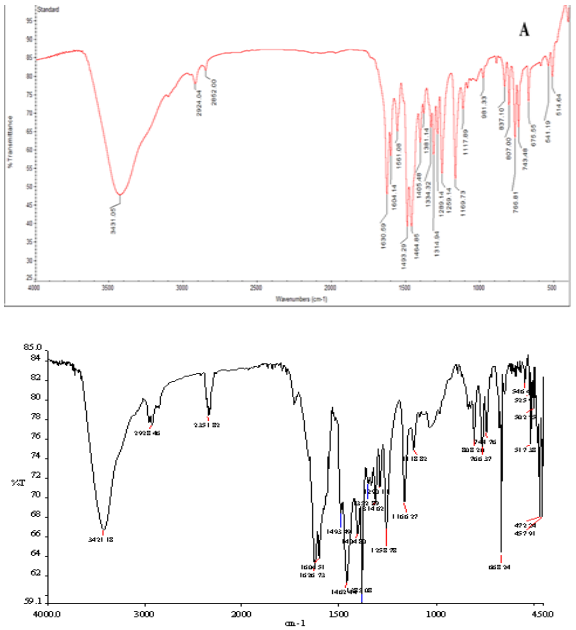
شکل ۱: مراحل استخراج رنگدانه پیوسیانین: ۱) محیط کشت حاوی رنگدانه، ۲) محیط حاوی رنگدانه پس از سانتریفوژ، ۳) اضافه کردن کلروفرم به نسبت مساوی، ٤) شیک کردن و حل شدن پیوسیانین در کلروفرم، ۵) اضافه کردن HCL، ٦) شیک کردن و تغییر رنگ رنگدانه، ۷) جداکردن بخش اسیدی (قرمز)، ۸) افزودن NaOH و بازیابی رنگ آبی، ۹) فیلتر کردن و ریختن داخل پلیت.

بررسی شد و بیشترین جذب را در طول موج ۲۷۸ نانومتر نشان داد که این قله نشان‌دهنده‌ی حضورترکیبات پیوسیانین بود (۱۲) (نمودار۱).



نمودار۱: اسپکتروفتومتری UV-Vis، سمت راست نمونه استاندارد (۱٤) و سمت چپ جذب پیوسیانین استخراج شده در تحقیق حاضر.

در طیف سنجی مادون قرمز تابش IR از نمونه می‌گذرد، مقداری از این تابش توسط نمونه جذب شده و مابقی از آن عبور می‌کند. طیف به‌دست آمده نشان‌دهنده جذب و انتقال مولکولی است که اثر انگشت نمونه مورد نظر را ایجاد می‌کند و این برای تجزیه و تحلیل نمونه مفید است زیرا برای هر نمونه منحصر به فرد می‌باشد (۱۵). تجزیه و تحلیل طیف سنجی مادون قرمز رنگدانه برای بررسی گروه‌های عاملی و پیوندهای شیمیایی موجود در ترکیب بررسی‌شد و نتایج حاصل از بررسی FTIR پیوسیانین دقیقا مطابق با طیف استاندارد ترکیب مورد نظر بود. برای مثال قله ۳۴۲۱/۱۸ حضور باند O-H و قله ۲۹۲۸/۴۶ حضور باند آروماتیک هیدروکربن C-H را در ترکیب تایید می‌کند. این باند در مقالات مختلف متفاوت بوده که گاهی در محدوده ۲۳۶۰ قرار داشته (۱۵)(۱۶) یا با توجه به نمودار استاندارد در محدوده ۲۹۰۰ قرار می‌گیرد. قله ۱۶۲۶/۷۳ نشان از حضور باند C=N و همین‌طور قله ۱۶۰۴/۵۱ حضور باند C=H است. حضور قله در ۱۲۵۸/۷۸ نشان از باند C-O می‌باشد و با توجه به این طیف و تطابق نسبتا کاملی که با طیف نمونه استاندارد پیوسیانین دارد متوجه حضور پیوسیانین و خلوص ترکیب حاصل شدیم (نمودار۲).



نمودار۲: طیف سنجی مادون قرمز، سمت راست نمونه استاندارد(۱۷)، سمت چپ نتیجه پودر استخراج شده پیوسیانین درتحقیق حاضر.

اثر رنگدانه پیوسیانین بر رشد انگل *تریکوموناس واژینالیس* به کمک ۵۰ میکرولیتر تریپان بلو و لام نئوبار بررسی و تعداد انگل زنده در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت زیر میکروسکوپ شمارش شد. تعداد انگل در غلظت‌های مختلف متفاوت بود چرا که رنگدانه پیوسیانین قابلیت مهار کامل رشد *تریکوموناس* را در غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت داشته و در غلظت ۵۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانایی مهار رشد را پس از ۴۸ ساعت داشت و تعداد انگل را به صفر رساند. هر چه غلظت رنگدانه پیوسیانین کمتر شد، تعداد انگل زنده نیز بیشتر می شد (جدول۱)(نمودار۳).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار حاصل از شمارش انگل *تریکوموناس واژینالیس* بعد از تماس با رنگدانه پیوسیانین.

غلظت رنگدانه پیوسیانین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تعداد انگل *تریکوموناس واژینالیس* (10^4)	
	شمارش انگل در۲۴ ساعت (10^4) (انحراف معیار)	شمارش انگل در ۴۸ ساعت (10^4) (انحراف معیار)
کنترل	۳۹/۳۳۳±۲/۰۸۱	۵۵±۴
۷۸	۲۴±۱	۱۲/۶۶۶±۱/۵۲۷
۱۵۶	۲۲±۲	۹/۳۳۳±۰/۵۷
۳۱۲	۱۷/۳۳۳±۱/۱۵۴	۶/۶۶۶±۰/۵۷
۶۲۵	۱۳/۶۶۶±۱/۵۲۷	۳/۳۳۳±۰/۵۷۷
۱۲۵۰	۱۰/۳۳۳±۱/۵۲۷	۱/۶۶۷±۰/۵۷۷
۲۵۰۰	۸/۶۶۶±۰/۵۷۷	۰
۵۰۰۰	۳/۶۶۶±۰/۵۷۷	۰
۱۰۰۰۰	۰	۰

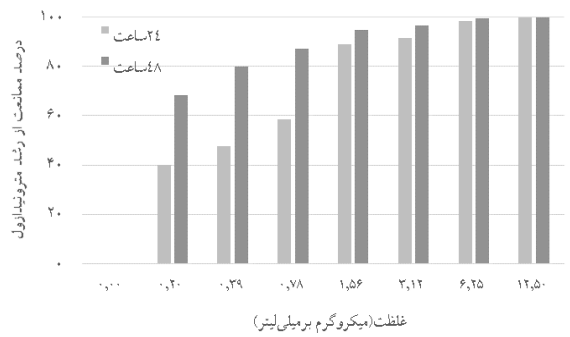
نمودار۳: بررسی درصد بازدارندگی رشد رنگدانه پیوسیانین بر انگل *تریکوموناس واژینالیس*.

درصد ممانعت از رشد انگل *تریکومونس واژینالیس* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف رنگدانه پیوسیانین در نمودار ۳ آورده شده است. داده‌ها بیانگر این است که در غلظت‌های ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ در ۲۴ ساعت ۷۷/۹۶، ۹۰/۶۷ و ۱۰۰ درصد و پس از ۴۸ ساعت در همه‌ی غلظت‌های ذکر شده ۱۰۰ درصد مانع رشد انگل شده است. میزان IC_{50} به کمک نرم افزار گراف‌پد در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۰۶/۹ و ۱۷/۴۴ به‌دست آمد. آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که در هر ۷ غلظت رنگدانه پیوسیانین مقایسه میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰۰۰۱/۰) بود. در غلظت‌های ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت به‌طور کامل باعث کشته شدن انگل شده و تاثیر آن با مرور زمان بر روی انگل بیشتر شده است.

به‌عنوان کنترل مثبت در کنار بررسی تاثیر رنگدانه پیوسیانین بر روی انگل *تریکومونس واژینالیس*، ۷ غلظت مختلف از داروی مترونیدازول مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از شمارش انگل به صورت جدول زیر بوده، این دارو در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور کامل انگل‌ها را از بین برده و به مرور که غلظت دارو کمتر شده رشد انگل بیشتر شد (جدول۲)(نمودار۴).

جدول۲: نتایج میانگین و انحراف معیار حاصل از شمارش انگل *تریکومونس واژینالیس* بعد از مواجهه با مترونیدازول.

غلظت مترونیدازول (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تعداد انگل *تریکومونس واژینالیس* (10^4)	
	شمارش انگل در۲۴ ساعت (10^4) (انحراف معیار)	شمارش انگل در ۴۸ ساعت (10^4) (انحراف معیار)
کنترل منفی	۳۹/۳۳±۳/۷۸	۵۱/۳۳±۳/۲۱
۰/۱۹۵	۲۳/۶۶±۱/۵۲	۱۶/۳۳±۲/۸۱
۰/۳۹	۲۰/۶۶±۱/۵۱	۱۰/۳۳±۱/۵۲
۰/۷۸	۱۶/۳۳± ۲/۰۸۱	۶/۶۶±۱/۵۲
۱/۵۶	۴/۳۳±۰/۵۷	۲/۶۶±۰/۵۷
۳/۱۲	۳/۳۳±۰/۵۷	۱/۶۶±۰/۵۷
۶/۲۵	۰/۶۶±۰/۵۷	۰/۳۳±۰/۵۷
۱۲/۵	۰	۰

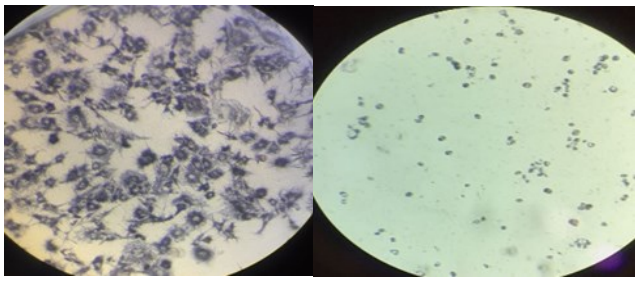


نمودار۴: درصد ممانعت از رشد *تریکومونس واژینالیس* بعد از افزودن مترونیدازول.

درصد ممانعت از رشد *تریکومونس واژینالیس* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف داروی مترونیدازول در نمودار۴ قابل مشاهده می‌باشد و داده‌های جدول بیانگر این است که در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۱۰۰درصد بوده و در غلظت ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۹۸ درصد در ۲۴ ساعت و ۹۹ درصد در ۴۸ ساعت مانع رشد انگل شده است.

میزان IC50 به کمک نرم افزار GraphPad Prism ۹ در۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۰/۳۷۷ و ۰/۰۸۸ به‌دست آمد. بررسی اختلاف معنی‌دار بودن غلظت و زمان داروی مترونیدازول بر روی *تریکومونس واژینالیس* با کمک این نرم‌افزار و به روش آنالیز واریانس دوطرفه انجام شده و مقایسه همه‌ی غلظت‌های مترونیدازول با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰۰۰۱/۰) بود.

برای بررسی سمیت رنگدانه، رده سلولی PC12 در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته شد و پلیت داخل انکوباتور CO2 دار قرار گرفت. نتایج حاصل از خوانش چاهک‌های پلیت تحت تیمار با داروی مترونیدازول و رنگدانه پیوسیانین به کمک نرم افزار Graphpad prism ۹ بررسی و مقادیر CC50 برای رنگدانه پیوسیانین ۹۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای مترونیدازول ۷۲/۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بعد از گذشت ۴۸ ساعت محاسبه گردید. کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ کف چاهک‌های کنترل و غلظت‌های کم رنگدانه قابل مشاهده بود (شکل۲).



شکل ۲: تصویرمیکروسکوپ اینورت از میکروپلیت تحت تیمار با رنگدانه پیوسیانین، سمت راست سلول زنده با کریستال‌های فورمازان و سمت چپ سلول‌های مرده تحت تیمار با غلظت بالای پیوسیانین.

شاخص انتخابی که در تعیین مرز بی‌خطر بودن داروها به کار می‌رود عبارت است از:

$SI = CC50/IC50$

و ترکیبی از نظر استفاده دارویی دارای اهمیت می‌باشد که برای میزبان سمیت نداشته ولی برای عامل عفونت کشنده باشد، هر چه شاخص انتخابی بالاتر باشد احتمال ایمن بودن ترکیب مورد استفاده بیشتر است (جدول ۳).

جدول۳: نتایج SI مترونیدازول و پیوسیانین.

ترکیب	۴۸ ساعت		
	شاخص انتخابی (SI)	حداکثرغلظت بازدارندگی (IC50)	سمیت (CC50)
مترونیدازول	۸۲۴/۲۰	۰/۰۸۸	۷۲/۵۳
پیوسیانین	۵۳/۳۲	۱۷/۴۴	۹۳۰

بحث

تریکوموناس واژینالیس انگل فلاژل‌داری است که باعث ایجاد واژینیت تریکومونایی می‌شود (۱۸). درمان اصلی استفاده از داروی مترونیدازول بوده که عوارض و اثرات جانبی بسیاری داشته و اغلب استفاده‌کنندگان به دلیل عوارض نامطلوب از مصرف آن ناراضی و طالب درمان‌های دیگری می‌باشند (۱۹) ضمنا نرخ این بیماری با سالانه حدود ۲۷۶/۴ میلیون مورد به عنوان شایع‌ترین عفونت غیرویروسی مقاربتی در جهان معرفی شده است (۲۰). بروز مقاومت دارویی روزافزون در *تریکوموناس واژینالیس* نسبت به مترونیدازول که احتمالا به دلیل جهش‌های این انگل بوده، به یک نگرانی جهانی تبدیل شده و انگیزه‌ای برای پیگیری داروهای جدید می‌باشد.

رنگ‌های طبیعی که منشاءهای بیولوژیکی همچون حشرات، میوه‌ها، سبزیجات، دانه‌ها و میکروارگانیسم‌ها دارند به‌عنوان رنگ‌های زیستی خوانده می‌شوند و طبقه‌بندی آن‌ها بر اساس منشاء، رنگ و ساختار شیمیایی آن‌ها می‌باشد. رنگ‌های مصنوعی با توجه به هزینه تولید پایین، پایداری و همچنین استفاده کمتر و رنگ بیشتر مورد استقبال قرار نگرفته است چرا که اثرات سمی و نامطلوبی بر محیط‌زیست و سلامت انسان می‌گذارد (۲۱).

گرچه گیاهان یک منشاء خوب برای تولید رنگ‌های مختلف هستند اما تعداد کمی از آن‌ها در طول سال در دسترس بوده، لذا رنگدانه‌های میکروبی به سبب استخراج راحت و در دسترس بودن، منابع ارجح‌تری می‌باشند. طی سال‌های گذشته، توجه به رنگدانه‌های میکروبی و نحوه استخراج و سنتز این رنگدانه‌ها بیشتر شده است. چرا که این فراورده‌های میکروبی در صنایع مختلف پزشکی، غذایی، رنگ‌آمیزی و غیره مورد استفاده قرار گرفته و فعالیت ضدسرطانی، ضدمیکروبی و ضدقارچی دارند. همچنین این رنگ‌ها سازگار با محیط‌زیست بوده و تجدیدپذیر می‌باشند (۲۱). از جمله منابع بزرگ و متنوع طبیعی، تولید رنگدانه میکروارگانیسم‌ها هستند چرا که فرآورده‌های تولیدی آن‌ها تنوع بسیار بالایی دارد. در تحقیق حاضر سعی نموده‌ایم تا رنگدانه پیوسیانین را با ایجاد شرایط بهینه برای *سودوموناس آئروژینوزا* با بیشترین میزان تولید کنیم و تاثیر رنگدانه پیوسیانین استخراج‌شده را به عنوان یک ترکیب طبیعی و دارای خواص احتمالی ضدتریکومونایی برای اولین بار بر روی انگل *تریکوموناس واژینالیس* ارزیابی کنیم. همچنین تاثیر رنگدانه پیوسیانین در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی PC12 به منظور بررسی میزان سمیت این رنگدانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

حمد (M.Hamad) و همکاران در سال ۲۰۲۰، فعالیت ضدباکتریایی پیوسیانین را علیه چندین‌گونه باکتری بیماری‌زای غذایی بررسی نمودند که همه‌ی غلظت‌های این رنگدانه در برابر باکتری‌ها، قطر هاله عدم رشد را در ۱۰/۸ تا ۳۲/۲ میلی‌متر

نشان دادند و هر چه غلظت پیوسیانین بیشتر شد، فعالیت ضدباکتریایی آن نیز افزایش یافت. پیوسیانین در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضدباکتریایی علیه *اشرشیا کلی* (*Escherchia coil*) را نشان داد که بالاتر از استاندارد آنتی‌بیوتیکی مورد نیاز در مهار این میکروب است. همچنین برای مشاهده فعالیت ضد باکتریایی بالاتر از استاندارد آنتی‌بیوتیکی، نیاز به ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در برابر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* (*Salmonella Typhi*) و *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و *کلبسیلا نومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) می‌باشد و نیز برای فعالیت ضدباکتریایی بالاتر از استاندارد تتراسایکلین در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* (*staphylococcus aureus*) و*سالمونلا انتریکا* (*Salmonella entrica*)، به ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیوسیانین نیاز است (۱۶). Abdul-Hussein و همکاران در سال ۲۰۱۶ تاثیر رنگدانه پیوسیانین را در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی سویه‌های مختلف بررسی نمودند. نتایج نشان داد که میزان ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین قطر هاله عدم رشد و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین قطر هاله عدم رشد علیه *سودوموناس* و *باسیلوس* داشته است. همچنین غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیوسیانین بیشترین قطر هاله عدم رشد و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین قطر علیه *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس*، *کاندیدا آلبیکنز* (*Candida albicans*) و *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) را نشان داده است (۲۲).

طبق تحقیق ژا (Zhae) و همکاران در سال ۲۰۱۴، توانایی پیوسیانین برای مهار سلول‌های سرطانی رده سلولی HepG2 بررسی شد، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پیوسیانین پیری سلول و آپوپتوز را تسریع می‌کند و باعث آسیب به DNA می‌شود که مربوط به تولید سوپراکسید است. استرس اکسیداتیو درون سلول‌ها می‌تواند تعداد زیادی از مولکول‌های داخل سلول، از جمله RNA، DNA، لیپیدها و پروتین را تغییر داده و به آن‌ها آسیب برساند که در نتیجه منجر به پیری، مرگ و آپوپتوز سلول می‌شود. مقدار IC_{50} به‌دست آمده از این تحقیق در مهار رده سلولی، ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۲۳). نتایج تحقیق صورت گرفته توسط معایدی (Moayedi) و همکاران در سال ۲۰۱۸، نشان داد که رنگدانه پیوسیانین استخراج شده از سویه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* اثرات مختلفی بر سلول‌های سرطانی پانکراس (Panc1) داشته است. در یک مورد، پیوسیانین با غلظت ۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۹۸ درصد و نوع دیگر با همین غلظت، ۸۹ درصد قابلیت مهار سلول‌های Panc1 را داشته‌اند. همچنین IC_{50} به‌دست آمده از تاثیر پیوسیانین بر سلول‌های Panc1 ۱۱۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط یک نوع پیوسیانین و ۲۸۷/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط نوع دیگر بود. در این تحقیق تفاوت قابل توجهی در IC_{50} پیوسیانین استخراج شده از دو ایزوله متفاوت *سودوموناس آئروژینوزا* وجود داشت (۲۴).

در تحقیق حسنی (Hassani) و همکاران در ۲۰۱۲، اثر سایتوتوکسیک پیوسیانین بر روی رده سلولی RD مورد مطالعه قرار گرفته است. پس از ۷۲ ساعت تیمار این رده سلولی بوسیله پیوسیانین استخراج شده از دو سویه متفاوت، میزان IC_{50} ۲۲۵ و ۵۷/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است که بیانگر تاثیر متفاوت پیوسیانین‌های استخراج شده از سویه‌های مختلف می‌باشد (۲۵).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر با توجه به اینکه اولین بررسی رنگدانه پیوسیانین بر روی انگل *تریکوموناس واژینالیس* بوده، با چند بار تکرار از غلظت‌های مختلف پیوسیانین بر روی انگل *تریکوموناس واژینالیس* انجام شد. با غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت، همه‌ی انگل‌ها کشته شدند و غلظت‌های ۵۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر طی ۲۴ ساعت، به ترتیب ۹۰/۶۷ ٪ و ۷۷/۹۶ ٪ سبب ممانعت از رشد انگل *تریکوموناس واژینالیس* شد و طی ۴۸ ساعت، در تمامی غلظت‌های فوق، ۱۰۰٪ انگل‌ها کشته شده و تعداد انگل به صفر رسید که این نتیجه با تحقیقات ذکر شده بر روی باکتری و قارچ، مطابقت داشت.

در این پژوهش، میزان IC_{50} پیوسیانین بر روی انگل

تریکوموناس واژینالیس به کمک نرم افزار GraphPad Prism ۹ محاسبه گردید که در ۲٤ ساعت ۹/۲۰٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ٤۸ ساعت ۱۷/٤٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. همچنین میزان CC_{50} این رنگدانه پس از ٤۸ ساعت ۹۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و شاخص SI آن ۳۲/۵۳ به‌دست آمده است که با توجه به اینکه پیوسیانین جدا شده از سویه‌های مختلف تاثیر متفاوتی دارند، ممکن است با توجه به نوع رده سلولی و مدت زمان تیمار، غلظت‌های مختلفی از رنگدانه پیوسیانین سمیت داشته باشد.

در تحقیقی که بهاروند (Baharvand) و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام داده‌اند، داروی مترونیدازول را روی *تریکوموناس* و نیز روی رده سلولی vero در بازه زمانی ۲٤ ساعت بررسی نموده‌اند. میزان IC_{50} را ۰/۰٤۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر، CC_{50} را ۷۰/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیترو میزان SI آن ۱٤۹٤/۲۵ به‌دست آمده است. در این پژوهش تاثیر مترونیدازول بر روی *تریکوموناس* و نیز بر روی رده سلولی PC12 در بازه زمانی ٤۸ ساعت انجام شد که میزان IC_{50} و CC_{50} به ترتیب ۰/۰۸۸ و ۷۲/۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد و میزان SI آن ۸۲٤/۲۰ محاسبه شد. نتایج فوق تا حدودی با پژوهش بهاروند هم‌خوانی دارد و این تفاوت می تواند به دلیل تفاوت زمان‌ها باشد.

نتیجه‌گیری

داروی انتخابی در درمان تریکومونیازیس، مترونیدازول می‌باشد. این دارو علاوه بر عوارض جانبی، به دلیل گزارشات مقاومت دارویی، قابل تامل بوده و امروزه محققان به دنبال یافتن راه‌های جدید در درمان این عفونت انگلی هستند. با توجه به اثرات رنگدانه پیوسیانین بر روی باکتری‌ها، قارچ‌ها و سلول‌های سرطانی و همچنین در دسترس بودن باکتری مولد، قابلیت تولید در حجم بالا و زیست‌تخریب‌پذیر بودن این ترکیب، تحقیق حاضر برای بررسی اثر این رنگدانه بر انگل *تریکوموناس واژینالیس* صورت گرفت. نتایج بیانگر موثر بودن این رنگدانه بر روی انگل نام برده می‌باشد و با غلظت بیشتر نیز برای رده سلولی سمیت داشت که نتیجه خوبی است اما شاخص درمانی آن بسیار کمتر از داروی مترونیدازول بود. تحقیق حاضر اولین مطالعه صورت گرفته از اثر پیوسیانین بر *تریکوموناس واژینالیس* بوده و لذا استفاده از این رنگدانه در درمان این عفونت انگلی، نیازمند تحقیقات بیشتر روی استخراج و خالص‌سازی آن از انواع جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا، به همراه آزمایشات تکمیلی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسنگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی از قبیل عدم سرقت ادبی، انتشار همزمان، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را رعایت نموده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی گرایش میکروب‌های بیماری‌زا دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج می‌باشد، بدین وسیله مراتب تشکر خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج دانشکده علوم و سرکار خانم صبوری زاده کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد واحد کرج ابراز می‌دارم.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Rein MF. Trichomoniasis. Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases:10th ed; Elsevier; 2020;731-733.
2. Van Gerwen O,1 Camino A Sharma J,1 Kissinger P, Muzny Ch.Epidemiology, Natural History, Diagnosis, and Treatment of *Trichomonas vaginalis* in Men; CID 2021:73 (15 September) 1119-1124. https://doi.org/10.1093/cid/ciab514.
3. Gahlout M · Chauhan P · Prajapati H · Tandel N · Rana S · Solanki D · Patel N. Characterization, application and statistical optimization approach for enhanced production of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa* DN9; Systems Microbiology and Biomanufacturing (2021) 1:459–470 https://doi.org/10.1007/s43393-021-00033-z
4. Saleem H, Mazhar S, Syed Q, Javed MQ, Adnan A. Bio-characterization of food grade pyocyanin bio-pigment extracted from chromogenic Pseudomonas species found in Pakistani native flora. Arab J Chem [Internet]. 2021;14(3):103005. Available from: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103005
5. Cheluvappa R. Standardized chemical synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. MethodsX [Internet]. 2014;1(1):67–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2014.07.001
6. Ozdal M. A new strategy for the efficient production of pyocyanin, a versatile pigment, in *Pseudomonas aeruginosa* OG1 via toluene addition. 3 Biotech [Internet]. 2019;9(10):1–8. Available from: https://doi.org/10.1007/s13205-019-1907-1
7. Ozdal M, Gurkok S, Gur O, Basaran E. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Enhancement of pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* via the addition of n -hexane as an oxygen vector. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. 2019;22 (August):101365. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101365
8. Devnath P, Uddin MK, Ahamed FMM, Hossain MT, Manchur MA. Extraction , purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Int Res J Biol Sci . 2017;6(5):1–9.
9. Nawas T. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. MOJ Toxicol. 2018;4(6);417-22.
10. Momeni Z, Sadraei J, Kazemi B, Dalimi A. Experimental Parasitology Molecular typing of the actin gene of *Trichomonas vaginalis* isolates by PCR-RFLP in Iran. Exp Parasitol [Internet]. 2015;159:259–63. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.10.011
11. Jali Azar A,Farhadi M,Torabzadeh P, Momeni Z.In vitro Effects of alchoholic and aquatic Extract of Physalis alkekengi on proliferation of *Trichomonas vaginalis*. IJOGI, Jan 2017, 19 (38), 48-56.
12. Diken Gü S r, Seyis Bilkay I, Bilen Özyürek S. Investigation of Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Clinical Specimens. Hacettepe J Biol Chem. 2016;1(44):1–6.

13. Mansourabadi A, Hematti M, Moradi A, Maghsoudi A. Evaluation of Curcumin and Quercetin Toxicity Effects on 4T1 Murine Breast Cancer Cell Line by MTT Method. Vol. 20, Iranian South Medical Journal. 2017.v.20. p. 1–8. [In Persion]

14. Sudhakar T, Karpagam S, Shiyama S. Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens. Int J ChemTech Res. 2013;5(3):1101–8.

15. Mullaiselvan I, Kanagaraj V, Dharmar B, Balaraman M, Meignanalakshmi S. Production, Characterization and Cytotoxic Evaluation of Pyocyanin Pigment Extracted from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Industrial Soil Resources. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2020;9 (3):2117–30.

16. Hamad MNF, Marrez DA, El-Sherbieny SMR. Toxicity evaluation and antimicrobial activity of purified pyocyanin from *pseudomonas aeruginosa*. Biointerface Res Appl Chem. 2020;10 (6):6974–90.

17. DeBritto S, Gajbar TD, Satapute P, Sundaram L, Lakshmikantha RY, Jogaiah S, et al. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. Sci Rep. 2020;10(1):1–12.

18. Bouchemal K, Bories C, Loiseau PM. Strategies for Prevention and Treatment of *Trichomonas vaginalis* Infections. 2017;30(3):811–25.

19. karimi F, Bakhshi M, Dadgar S, Maleki Saghooni N.Review of anti-*Trichomonas vaginalis* herbs and their therapeutic effects. IJOGI, Feb 2018, 20 (12), 96-109. [In Persian]

20. Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues. BMC Infect Dis [Internet]. 2015;15(1):1–8. Available from: http://dx.doi.org/10. 1186/s12879-015-1055-0

21. Najafi E, Nakhaei Moghaddam M, Najafi M, Yousefi E. Application of phenazine pigment of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to prepare colored paper and candel, NCMBJ ,2021,11/44,29-39. [In Persian]

22. Zr A, Ss A. Antimicrobial Effect of Pyocyanin Extracted from *Pseudomonas aeroginosa* Keywords : iMedPub Journals. 2016;6(6:3):4–7.

23. Zhao J, Wu Y, Alfred AT, Wei P, Yang S. Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells. Lett Appl Microbiol. 2014;58(6):541–8.

24. Moayedi A, Nowroozi J, Akhavan Sepahy A. Cytotoxic effect of pyocyanin on human pancreatic cancer cell line (Panc-1). IJBMS. 2018;21(8):794–9.

25. Hassani HH, Hasan HM, Al-Saadi A, Ali AM, Muhammad MH. A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. PRIME .2012;2012(5):1389–94. Available from: www.pelagiaresearchlibrary.com